



---

*Importancia del infiltrado inflamatorio y la neovascularización asociada al melanoma y su correlación con el desarrollo de metástasis: Estudio inmunohistoquímico de 81 casos. Árboles de decisión basados en “Machine learning”*

---

TESIS DOCTORAL



MADRID 2020

IRENE SALGÜERO FERNÁNDEZ

Directores: Prof Dr Gastón Roustán Gullón, Prof Dra Laura Nájera Botello

## TÍTULO TESIS

Importancia del infiltrado inflamatorio y la neovascularización asociada al melanoma y su correlación con el desarrollo de metástasis: Estudio inmunohistoquímico de 81 casos. Árboles de decisión basados en “Machine learning”

## INTRODUCCIÓN

El melanoma es un tumor derivado de los melanocitos. A pesar de que representa un 2- 3% de todos los tumores malignos de piel, supone la causa más frecuente de muerte por cáncer cutáneo. En los últimos años se ha incrementado su incidencia, no así su mortalidad, probablemente debido a un diagnóstico más precoz y en estadios iniciales. Se estima que la incidencia se ha incrementado un 3-7% cada año durante los últimos 50 años en la raza blanca. Su incidencia aumenta a un ritmo mayor que el de la mayoría de los tumores sólidos, siendo un tumor potencialmente muy agresivo que afecta a una población cada vez más joven. Los últimos hallazgos en la genética, la inmunología y el tratamiento de melanoma hacen que haya pasado de ser un tumor con mal pronóstico cuando es invasivo a una prolongación significativa de la esperanza de vida de estos pacientes. Por todo ello la investigación en este tumor continúa siendo de vital importancia en el momento actual.

La respuesta inmune a los tumores sólidos entre los que se encuentra el melanoma está cobrando cada vez más importancia por las implicaciones pronósticas que tiene y los posibles tratamientos inmunodirigidos. La forma de estudiar esta respuesta inmune es muy variada y una forma de hacerlo es mediante el estudio del infiltrado inflamatorio asociado a los mismos. El infiltrado inflamatorio en los tumores fue descrito por primera vez por Virchow en 1863 y se pensaba entonces que el cáncer se originaba en sitios de inflamación crónica y el tumor crecía debido a este proceso inflamatorio. Sin embargo, pronto se observó que no era que el infiltrado inflamatorio fuera el origen del cáncer sino al contrario, las células del sistema inmunitario del huésped aparecían como un mecanismo de defensa frente al tumor y su presencia se relacionaba con un mejor pronóstico. En el caso del melanoma, el estudio del infiltrado inflamatorio se lleva realizando desde hace años y es bien conocida su importancia pronóstica y como marcador de respuesta a los nuevos tratamientos inmunoterápicos.

La composición del TIL es heterogénea y engloba no solamente linfocitos T reguladores (Treg) sino otras muchas células como linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células naturales Killer (NK), macrófagos, células dendríticas y células supresoras derivadas de la médula ósea, entre otras. El conocimiento del fenotipo y función de estas células es imprescindible para el estudio del microambiente tumoral y los posibles tratamientos dirigidos a estos.

Por otro lado, la angiogénesis y linfangiogénesis juegan un papel fundamental en el desarrollo de las metástasis del melanoma y la progresión del mismo. En los últimos años numerosos estudios han investigado la importancia clínica y como factor pronóstico de estos fenómenos y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha llevado a un mejor conocimiento de la angiogénesis/linfangiogénesis en el melanoma.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Es por tanto fundamental realizar trabajos de investigación sobre los marcadores que nos permitan identificar a los pacientes que van a desarrollar dichas metástasis. Recientemente se ha utilizado el término de “endofenotipo” para nombrar/identificar aquellos marcadores propios de cada individuo que pueden relacionarse en estos casos con el desarrollo de metástasis.

En los últimos años se han adquirido relevancia dos aspectos fundamentales en el desarrollo de las mismas: el sistema inmune y la neovascularización.

Con esta base nos planteamos el estudio del infiltrado inflamatorio acompañante del melanoma mediante el análisis de los distintos componentes del mismo utilizando técnicas de inmunohistoquímica (CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD40, GZMB) y el análisis de la neovascularización mediante el estudio de los vasos en el TIL en dos series de pacientes con melanoma metastásico y no metastásico.

Y apoyándonos en la inteligencia artificial en su rama de “Machine Learning” crear árboles de decisión que nos permitieran con los datos de endofenotipo de nuestros pacientes predecir cuáles van a desarrollar metástasis y cuáles no.

### **Objetivos:**

- a) Describir las características clínicas y anatomopatológicas de nuestra serie de pacientes con melanoma metastásico y no metastásico.
- b) Describir las características inmunohistoquímicas del infiltrado inflamatorio acompañante de los melanomas primarios metastásicos y no metastásicos.
- c) Comparar las características inmunohistoquímicas del infiltrado inflamatorio asociado a tumor (TIL) de los melanomas primarios metastásicos con las de los no metastásicos.
- d) Describir la densidad de vasos (endoteliales y linfáticos) asociados al tumor en los melanomas primarios metastásicos y en la de los no metastásicos.
- e) Comparar la densidad de vasos tumorales entre los melanomas primarios metastásicos con la de los no metastásicos.
- f) Creación de árboles de decisión basados en “Machine learning” que nos permitan, a partir de características anatomopatológicas y de IHQ, predecir qué pacientes van a desarrollar metástasis y cuáles no.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se plantea un estudio retrospectivo de casos y controles analíticos, con análisis de muestras del servicio de anatomía patológica del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid) entre los años 2000-2020 de melanomas cutáneos primarios metastásicos y de melanomas primarios no metastásicos diagnosticados en este hospital. No se tomaron nuevas muestras de pacientes ni se realizaron procedimientos invasivos.

## Selección casos y controles

En el estudio se recogen 2 series de melanomas. La primera serie, está constituida por 40 melanomas cutáneos metastásicos (incluyéndose metástasis ganglionares y viscerales), cuyas muestras histológicas se conservan en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se incluyen todos los casos diagnosticados en ese periodo de los cuales se tiene material anatomopatológico tanto del primario como de las metástasis subsecuentes.

- Criterios de inclusión:

- 1) Diagnóstico histológico de melanoma cutáneo y diagnóstico histológico de metástasis ganglionar o visceral.
- 2) Disponibilidad de muestra histológica tanto del primario como de las metástasis subsecuentes.
- 3) Seguimiento clínico y disponibilidad de la información clínico-patológica.

- Criterios de exclusión:

- 1) Melanoma de localización extra-cutánea. Se excluyeron los melanomas coroides y los melanomas de mucosas.
- 2) Metástasis de melanomas de las que no se disponía del melanoma primario.
- 3) Melanomas primarios de los cuales no se disponía de material anatomopatológico de las metástasis.
- 4) Tamaño del tumor insuficiente para la realización de las técnicas del estudio.

La segunda serie incluye 41 melanomas cutáneos no metastásicos diagnosticados entre enero 2010 y enero 2020, cuyas muestras histológicas se conservan en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se seleccionaron los controles en ese periodo de tiempo de manera aleatoria de manera que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Melanoma cutáneo con diagnóstico histológico de melanoma con índice de Breslow  $> 1$  mm al que se le ha realizado ganglio centinela siendo este negativo y que durante el periodo de seguimiento no ha desarrollado metástasis.
- 2) Melanomas de los que se disponía de la muestra histológica del melanoma primario.
- 3) Seguimiento clínico y disponibilidad de la información clínico-patológica.

Criterios de exclusión:

- 1) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con un índice de Breslow  $< 1$  mm.
- 2) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con índice de Breslow  $> 1$  mm que fueron positivos.
- 3) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con índice de Breslow  $> 1$  mm y que desarrollaron progresión metastásica de la enfermedad en el periodo de seguimiento.
- 4) Melanomas cutáneos de los que no se disponía de la muestra histológica (por proceder de otro centro u otras causas).

5) Melanomas con regresión histológica completa.

6) Melanomas coroides o de mucosas.

Se recogen variables demográficas, clínicas, anatomopatológicas y de seguimiento de forma retrospectiva y se realizan estudios inmunohistoquímicos en muestras histológicas disponibles en el servicio de anatomía patológica del hospital. Una vez seleccionados los pacientes, se revisaron las historias clínicas de todos ellos y se recogieron los datos de interés que se detallan en la tesis así como su evolución. Las 81 muestras se procesaron de manera similar en el servicio de anatomía patológica de este hospital.

Los datos recogidos de todas las variables clínicas, histológicas y de inmunohistoquímica se incluyeron en una base de datos (Microsoft Excel).

Se ha realizado un estudio a doble ciego. Los datos de los pacientes que pertenecían a cada grupo (metastásicos y no metastásicos) fueron codificados. La persona que evaluó las imágenes de la histopatología e hizo las medidas de las variables estudiadas no conocía a qué grupo pertenecía cada paciente. La persona que llevó a cabo el estudio estadístico tampoco sabía qué grupo era cada uno. Sólo tras terminar el análisis estadístico se rompió la codificación.

El estudio estadístico fue realizado con el paquete estadístico R 4.0.1. (R Core Team, 2020).

Las variables que se expresan en proporciones se describen numéricamente como porcentajes y en gráficas como histogramas. Los datos continuos se describen numéricamente como media y desviación estándar, y en gráficas como mediana, rango intercuartil y extremos.

Para comparar los dos grupos (metastásicos y no metastásicos) se han realizado dos estudios estadísticos.

El primero ha consistido en un análisis univariante, mediante una prueba Chi cuadrado para comparar proporciones en las variables sexo, localización BANS, ganglio centinela, positivo/negativo, linfadenectomía, estado último seguimiento, tipo de melanoma primario, regresión, TIL, nevus previo, invasión linfática, invasión vascular, invasión perineural, metástasis ganglionares y metástasis viscerales; mientras que las variables numéricas como el índice de Breslow y edad al diagnóstico del melanoma primario han sido comparadas con la prueba t de Student.

El segundo análisis ha utilizado las técnicas de Machine Learning Árboles de Regresión y Clasificación (Classification and Regression Trees – CART) y Bosques Aleatorios (Random Forests) para buscar patrones que permitieran clasificar los pacientes en los dos grupos (metastásicos y no metastásicos). Para estudiar los CART se ha usado la función `rpart` del paquete estadístico `rpart` de Therneau y Atkinson. El número mínimo de observaciones por nodo para intentar una partición ha sido de 15. Los árboles de clasificación y de regresión se dibujaron con la función `rpart.plot` del paquete `rpart.plot` de Milborrow. Los datos también fueron analizados con el paquete estadístico `randomForest` para R de Liaw y cols. Este paquete selecciona de forma aleatoria el 66,7% de los resultados como muestra de aprendizaje (learning sample en inglés) para fabricar un árbol de clasificación con esos datos. En 96 este caso se consideró que cada nodo debía tener al menos 5 casos. El resto de los datos (33,3% de los resultados, llamados en estadística “datos fuera de la bolsa” (out-of-bag) se emplean para determinar la sensibilidad y especificidad del árbol de clasificación. Este proceso genera un

árbol de clasificación cada vez, proceso que fue repetido 1000 veces. El proceso de repetición se llama en inglés bootstrap

## RESULTADOS:

### 1.-Análisis univariante separando el grupo de los melanomas metastásicos y los no metastásicos:

En el grupo de los melanomas metastásicos observamos que 26 pacientes (65%) son varones y 14 mujeres (35%) con una edad media al diagnóstico del tumor primario de 61,5 años. En 24 pacientes (60%) el melanoma estaba localizado en una zona no clasificada de alto riesgo (no BANS). En este grupo de pacientes se realizó ganglio centinela en 19 pacientes (47,5%) y fue positivo en 13 de ellos (68,4%) realizándose linfadenectomía en 18 pacientes (45%) y no realizándose en 22(55%).

En cuanto al estado del último seguimiento disponible 15 pacientes (37,5%) habían fallecido por melanoma, 6 (15%) por otras causas y 12 (30%) continuaban vivos en el momento del análisis. Si nos fijamos en el estudio histológico en este grupo, el tipo de melanoma primario fue en 2 pacientes (5%) de LMM, en 11 (27%) un MES, en 6 (15%) un MLA y 17 (42,5%) un MN.

La media del espesor de Breslow fue de 5 mm, se objetivó regresión histológica en 14 pacientes (35%), invasión linfovascular en 3 pacientes (7,5%) e invasión perineural en 5 (12,5%). En 8 pacientes (20%) se identificó nevus asociado.

En cuanto al infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL), fue catalogado como ausente en 11 pacientes (27,5%), como enérgico en 9 (22,5%) y como no enérgico en 20 (50%). En la evolución, 32 pacientes (80%) desarrollaron metástasis ganglionares en el tiempo de seguimiento y 24 (60%) metástasis viscerales.

En el grupo de los melanomas no metastásicos, 12 pacientes (29,3%) eran varones y 29 mujeres (70 %). En cuanto a la localización del melanoma primario en 16 pacientes (39%) estaba localizado en zonas catalogadas como de alto riesgo y en 25 (61%) en otras áreas. La edad media en este grupo fue de 63,6 años.

A todos los pacientes de este grupo se les realizó ganglio centinela siendo negativo en todos ellos (se consideraba criterio de inclusión). En el último seguimiento ninguno de los pacientes había fallecido por el melanoma, 1 paciente había fallecido por otras causas (un accidente de tráfico), en 5 pacientes (12,2%) habíamos perdido el seguimiento y 35 pacientes (85,4%) estaban vivos en el momento del análisis.

Si nos fijamos en el melanoma primario, 7 pacientes (17,1%) tenían un LMM, 24 pacientes (58,5%) un MES, 2 pacientes un MLA (4,9%) y 8 (19,5%) un MN. La media del índice de Breslow en este grupo fue de 2,2 mm. En cuanto a otras características histológicas, no observamos regresión histológica en 20 pacientes (48,8%) y sí en 21(51,2%). Observamos nevus previo en 3 pacientes (7,3%) mientras que en 38 pacientes (92,7%) no lo encontramos. Se objetivó invasión linfática en 2 pacientes (4,9%), invasión vascular en 1 paciente (2,4%) e invasión perineural también en 1 paciente (2,4%). Centrándonos en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL), en 6 pacientes (14,63%) fue catalogado como ausente, en 26 pacientes (63,4%) como enérgico y en 9 pacientes (22%) como no enérgico. En el tiempo de seguimiento no se observó desarrollo de metástasis viscerales ni ganglionares

### 2.- Comparación de las poblaciones linfocitarias en los grupos metastásico y no metastásico

Centrándonos en el estudio de las poblaciones linfocitarias vemos que en el grupo de los metastásicos hay una expresión de CD3 catalogada como alta en 28 pacientes (36,4%) en comparación con 39 pacientes (50%) en el grupo de los melanomas no metastásicos, y aunque se observa en el grupo de los no metastásicos una mayor expresión de CD3, en nuestra serie las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas  $p=0,121$ .

En cuanto a la expresión de CD4, si comparamos ambos grupos, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas con  $p<0,001$ . También encontramos diferencias marcadas estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de CD8, de tal manera que en el grupo de metastásicos encontramos una expresión de CD8 alta en 12 pacientes (15,8%) y baja en 64 pacientes (84,2%) mientras que en el grupo de los no metastásicos vemos una expresión alta en 45 pacientes (57%) y baja en 34 (43%). Las diferencias son especialmente marcadas en cuanto a la expresión de este marcador IHQ en ambos grupos. En la expresión de CD20 y FOXP3 no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Si nos fijamos en la expresión de PD1 también encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, de tal manera que la expresión de PD1 es alta en un 29% de los metastásicos en comparación con una expresión alta de PD1 en el 14% de los no metastásicos. En cuanto a la neovascularización, evaluada mediante la expresión de CD31 encontramos en el grupo de los metastásicos una media de 16,9 vasos por campo evaluado en comparación con 9,4 en el grupo de los no metastásicos con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al evaluar la densidad de vasos linfáticos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

### 3.- Árboles y bosques de clasificación

En nuestro análisis de estos dos grupos nos preguntamos si con toda esta información de las poblaciones linfocitarias y la vascularización en nuestra muestra de pacientes podríamos clasificarlos a priori como metastásicos o no metastásicos, es decir si realizando el análisis de CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD20, CD31 y D2-40 en las muestras de los melanomas primarios podríamos predecir si van a desarrollar metástasis o no.

Para esto, en la segunda parte del análisis estadístico utilizamos las técnicas de inteligencia artificial de Machine Learning Árboles de Regresión y Clasificación (Classification and Regression Trees – CART) y Bosques Aleatorios (Random Forests). Estas engloban un conjunto de técnicas supervisadas no paramétricas que consiguen segmentar el espacio de los predictores en regiones simples, dentro de las cuales es más sencillo manejar las interacciones y predecir la variable respuesta.

## CONCLUSIONES

- 1) Los melanomas primarios metastásicos tienen un TIL catalogado como ausente o “no energético” en la mayoría de los casos estudiados.
- 2) Los melanomas primarios no metastásicos tienen un TIL catalogado como “energético” en la mayoría de los casos estudiados.
- 3) El infiltrado inflamatorio asociado al tumor en nuestra serie de melanomas está compuesto en su mayoría por linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) siendo muy escasos los linfocitos B o las células NK.
- 4) El TIL en los melanomas metastásicos tiene una expresión de CD4 y CD8 catalogada como baja en la mayoría de los casos, mientras que los melanomas no metastásicos tienen una expresión de CD4 y CD8 catalogada como alta en la mayoría de los casos.
- 5) La expresión de PD1 es mayor en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor en los melanomas metastásicos que en el TIL de los melanomas no metastásicos, en nuestra serie.
- 6) En los melanomas metastásicos encontramos un incremento de vasos sanguíneos en comparación con los melanomas no metastásicos, sin embargo, no encontramos diferencias en el número de vasos linfáticos.
- 7) Si nos apoyamos en las técnicas de “Machine learning” los marcadores de IHQ que mayor relevancia tienen a la hora de predecir si un paciente va a desarrollar metástasis o no son el índice de Breslow, la cuantificación de vasos sanguíneos mediante CD31 y la cantidad de linfocitos T citotóxicos cuantificada mediante expresión con CD8.



ÍNDICE.....	1
Lista de figuras.....	6
Lista de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Historia del melanoma .....	13
1.2 Epidemiología del melanoma.....	14
1.2.1 Incidencia.....	14
1.2.2 Factores de riesgo.....	15
1.2.2.1. Radiación ultravioleta.....	15
1.2.2.2 Geografía.....	15
1.2.2.3 Fototipo.....	15
1.2.2.4 Antecedentes familiares.....	16
1.2.2.5 Número de nevus comunes, nevus congénitos y nevus displásicos o atípicos.....	17
1.2.2.6 Edad.....	18
1.2.2.7 Inmunosupresión o alteraciones genéticas.....	18
1.3 Tipos histológicos clásicos del melanoma.....	19
1.3.1 Léntigo maligno melanoma.....	19
1.3.2 Melanoma de extensión superficial.....	21
1.3.3 Melanoma nodular.....	21
1.3.4 Melanoma lentiginoso acral.....	22
1.4 Clasificación genética actual.....	22
1.5 Factores pronósticos en el melanoma.....	24
1.5.1 Factores morfológicos.....	24
1.5.1.1 Niveles de Clark e Índice de Breslow.....	24
1.5.1.2 Ulceración.....	25
1.5.1.3 Índice mitótico.....	26
1.5.1.4 Satelitosis.....	27
1.5.1.5 Presencia de infiltrado inflamatorio acompañante (TIL.....	28

1.5.1.5.1 Clasificación del infiltrado inflamatorio tumoral (TIL).....	28
1.5.1.5. 2 Inmunobiología del infiltrado inflamatorio tumoral y escape inmunológico del melanoma.....	30
1.5.1.5.3 Inmunohistoquímica (IHQ) en el TIL.....	32
1.5.1.5.4 Correlación del infiltrado inflamatorio tumoral con la afectación ganglionar.....	32
1.5.1.5.5 Estudio del infiltrado inflamatorio en las metástasis de melanoma.....	32
1.5.1.5.6 Estudio del infiltrado inflamatorio en el estroma del melanoma.....	32
1.5.1.5.7 Estudio del infiltrado inflamatorio como predictor de respuesta de nuevos tratamientos inmunoterápicos.....	33
1.5.1.5.8 Abordaje del TIL en melanoma.....	34
1.5.1.5.9 Correlación del TIL con la supervivencia.....	34
1.5.1.6 Subtipo histológico.....	35
1.5.1.7 Invasión vascular y angiogénesis.....	35
1.5.1.7.1 Factores implicados en la angiogénesis.....	36
1.5.1.7.2 Aspectos histopatológicos de la angiogénesis en el melanoma.....	38
1.5.1.7.3 Inmunohistoquímica de la angiogénesis en el melanoma.....	38
1.5.1.7.4 Implicaciones clínicas y pronósticas de los distintos Biomarcadores.....	39
1.5.1.8 Tasa de crecimiento del melanoma.....	41
1.5.2 Factores clínicos.....	41
1.5.2.1 Sexo.....	41
1.5.2.2 Edad.....	43
1.5.2.3 Localización del tumor primario.....	43
1.5.3 Factores genéticos/ moleculares/ inmunológicos.....	44
1.5.3.1 Factores genéticos.....	44
1.5.3.2 Factores inmunológicos.....	50
1.5.4 Estudios genéticos realizados comparando los melanomas primarios y sus metástasis....	51
1.5.4.1 Concordancia mutacional entre tumor primario y sus metástasis en BRAF Y NRAS.....	51
1.5.4.2 Concordancia mutacional entre tumor primario y sus metástasis en CKIT.....	52
1.5.4.3 Concordancia mutacional entre primario y metástasis en GNAQ/GNA11.....	53
1.6 Estadificación del melanoma.....	53

1.7 Diagnóstico histológico del melanoma.....	56
1.7.1 Diagnóstico mediante H-E.....	56
1.7.2 Inmunohistoquímica en el melanoma.....	57
1.7.3 Marcadores inmunohistoquímicos utilizados para el estudio del TIL.....	61
1.7.4 Marcadores inmunohistoquímicos utilizados para el estudio del endotelio.....	61
1.7.5 Nuevas técnicas de diagnóstico FISH/HGC.....	62
1.7.5.1 Hibridación genómica comparada (HGC).....	64
1.7.5.2 Fluorescencia de hibridación in situ (FISH).....	64
1.8 Opciones terapéuticas en el melanoma.....	66
1.8.1 Tratamiento del melanoma localizado estadios I y II.....	66
1.8.2 Tratamiento del melanoma metastásico regional: Estadio III.....	66
1.8.3 Tratamiento del melanoma con metástasis a distancia (estadio IV).....	67
1.8.3.1 Quimioterapia clásica.....	67
1.8.3.2 Cirugía.....	67
1.8.3.3 Radioterapia.....	68
1.8.3.4 Tratamiento dirigido.....	68
1.8.3.5 Inmunoterapia.....	68
2. Hipótesis y objetivos.....	71
2.1 Hipótesis.....	73
2.2 Objetivos.....	74
3.- Material y métodos.....	77
3.1 Muestras a estudio.....	78
3.2 Selección de los casos.....	78
3.3 Variables clínicas estudiadas.....	81
3.4 Variables anatomopatológicas estudiadas.....	82
3.5 Variables inmunohistoquímicas estudiadas del infiltrado inflamatorio y de los vasos tumorales.....	84
3.6 Construcción de los “ <i>Tissue Microarrays</i> ” TMA o matrices tisulares.....	87
3.6.1 Concepto de matriz de tejidos.....	87

3.6.2. Construcción de los “ <i>Tissue Microarrays</i> ” o matrices tisulares.....	89
3.7 Valoración de las muestras y valoración de la IHQ.....	93
3.8 Almacenamiento de datos y estudio estadístico.....	95
4. Resultados.....	97
4.1 Variables categóricas estudiadas.....	99
4.1.1 Análisis univariante sin comparar el grupo de los metastásicos y los no metastásicos.....	99
4.1.2 Análisis univariante separando ambos grupos (metastásicos y no metastásicos).....	101
4.1.3 Análisis univariante comparando metastásicos y no metastásicos.....	106
4.2. Estudio de las poblaciones linfocitarias.....	113
4.2.1 Estadística descriptiva de las poblaciones linfocitarias.....	113
4.2.1.1 Comparación de las poblaciones linfocitarias de los grupos metastásicos y no metastásicos.....	113
4.2.1.2 Significación de las variables estudiadas mediante inmunohistoquímica incluyendo como variable el índice de Breslow.....	129
4.2.1.3 Comparación de edad en función de las poblaciones linfocitarias.....	121
4.2.2 Árboles y bosques de clasificación.....	125
4.2.2.1 Árbol de clasificación metástasis.....	125
4.2.2.2 Bosque aleatorio metástasis.....	126
4.2.2.3 Árbol de clasificación incluyendo como variable el índice de Breslow.....	128
4.2.2.4 Bosque aleatorio incluyendo como variable el índice de Breslow.....	129
4.2.2.5 Árbol de clasificación para predecir el índice de Breslow.....	130
4.2.2.6 Bosque de clasificación índice de Breslow.....	130
5. Discusión.....	131
5.1 Epidemiología.....	133
5.1.1 Sexo.....	133
5.1.2 Edad.....	134
5.1.3 Localización melanoma primario.....	135
5.2. Factores histopatológicos del melanoma primario.....	137
5.2.1 Tipo de melanoma primario.....	137
5.2.2 Grosor tumoral.....	138

5.2.3 Regresión histológica.....	139
5.2.4 Nevus previo asociado.....	140
5.2.5 Infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL).....	141
5.2.6 Invasión vascular.....	142
5.2.7 Neurotropismo.....	143
5.3 Discusión poblaciones linfocitarias.....	144
5.3.1 Expresión de CD3.....	145
5.3.2 Expresión de CD4 y FOXP3.....	146
5.3.3 Expresión de CD8.....	149
5.3.4 Limitaciones en el estudio mediante inmunohistoquímica de CD4 y CD8.....	150
5.3.5 Estudio de linfocitos B CD 20 +.....	150
5.3.6 Expresión de PD1.....	152
5.4 Angiogénesis y linfangiogénesis.....	156
5.4.1 Angiogénesis y linfangiogénesis.....	156
5.4.2 Estudios de linfangiogénesis en melanoma.....	157
5.4.3 Estudios de angiogénesis en melanoma.....	160
5.5 Machine learning o aprendizaje automático.....	161
6. Nuevas líneas de investigación.....	165
7. Relevancia y limitaciones del estudio.....	169
8. Conclusiones.....	173
9. Bibliografía.....	177

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación TIL, modificada de Mihm y cols<sup>74</sup>.

Figura 2: Abordaje TIL en melanoma, modificado de Hendry S y cols<sup>78</sup>.

Figura 3: Supervivencia en función de las mutaciones MC1R tomada de Lira Fe y cols<sup>142</sup>.

Figura 4: Alteraciones genómicas detectadas mediante HGC en melanomas y nevus. Tomada de Bastian BC y cols<sup>7</sup>.

Figura 5: Construcción de tissue microarray descrita por Kononen y cols<sup>222</sup>.

Figura 6: Selección de zonas más representativas de las presentaciones histológicas.

Figura 7: Selección de los bloques donantes.

Figura 8: Manual Tissue Microarrayer modelo MTA-1. Beecher<sup>R</sup>.

Figura 9a y 9b: Imagen de los cristales TMAs contruidos y detalle del mismo.

Figura 10: Ejemplos de melanoma del grupo de melanomas metastásicos (LMM y MES).

Figura 11: Ejemplos de melanoma del grupo de melanomas metastásicos (MLA y MN).

Figura 12: Ejemplos de melanoma del grupo de melanomas no metastásicos (LMM y MES).

Figura 13: Ejemplos de melanoma del grupo de melanomas no metastásicos (MLA y MN).

Figura 14: Ejemplo de melanoma nodular con invasión linfática.

Figura 15: Ejemplo de melanoma de células fusiformes con invasión perineural.

Figura 16: Ejemplos de infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL).

Figura 17: Diagrama de barras distribución por sexo.

Figura 18: Diagrama de barras, localización melanomas.

Figura 19: Diagrama de barras, estado en el último seguimiento.

Figura 20: Diagrama de barras, subtipo histológico de melanoma primario.

Figura 21: Diagrama de barras, regresión histológica.

Figura 22.- Diagrama cajas y bigotes de edad al diagnóstico del melanoma primario.

Figura 23: Diagrama de cajas y bigotes de índice de Breslow en el melanoma primario.

Figura 24: Diagrama de cajas y bigotes de tiempo de seguimiento.

Figura 25: Ejemplos de TMAS CD3 y CD8 pacientes metastásicos.

Figura 26: Ejemplos de TMAS CD20 y CD4 en el grupo de los metastásicos.

Figura 27: Ejemplos de TMAS FOXP3 y PD1 en el grupo de los metastásicos.

Figura 28: Ejemplos TMAS de CD31 y D2-40 en el grupo de los metastásicos.

Figura 29: Ejemplos TMAS de CD3 y CD8 en el grupo de los no metastásicos.

Figura 30: Ejemplos TMAS de CD4 y CD20 en el grupo de los no metastásicos.

Figura 31: Ejemplos TMAS de FOXP3 y PD1 en el grupo de los no metastásicos.

Figura 32: Ejemplos TMAS de CD31 y D2-40 en el grupo de los no metastásicos.

Figura 33: Diagrama de barras de CD3 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 34: Diagrama de barras de CD4 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 35: Diagrama de barras de CD8 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 36: Diagrama de barras de CD20 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 37: Diagrama de barras de FOXP3 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 38: Diagrama de barras de PD1 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 39: Diagrama caja-bigotes de FOXP3 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 40: Diagrama de barras de PD1 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 41: Diagrama cajas-bigotes D2-40 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 42: Diagrama de barras D2-40 en los grupos de metastásicos y no metastásicos.

Figura 43: Árbol de clasificación de metástasis.

Figura 44: Bosque aleatorio metástasis.

Figura 45: Árbol de clasificación incluyendo como variable el índice de Breslow.

Figura 46: Bosque aleatorio incluyendo como variable el índice de Breslow.

Figura 47: Árbol de clasificación para predecir el índice de Breslow.

Figura 48: Bosque de clasificación índice de Breslow.

## TABLAS

Tabla 1.- Resumen mutaciones en función de la exposición solar.

Tabla 2: Mutaciones genéticas frecuentes en los melanomas e implicaciones clínicas y pronósticas. Modificada de Davis EJ y cols <sup>159</sup>.

Tabla 3: Clasificación TNM del melanoma AJCC 2018 <sup>60</sup>.

Tabla 4: Inmunohistoquímica de los tumores melanocíticos. Modificada de Prieto y Shea <sup>188</sup>.

Tabla 5: Resumen de anomalías más frecuentes .Modificada de Bastian BC y cols <sup>7</sup>.

Tabla 6: Variables clínicas estudiadas.

Tabla 7: Variables anatomopatológicas estudiadas.

Tabla 8: Anticuerpos, clones, casas comerciales, diluciones y protocolos de desenmascaramiento utilizados.

Tabla 9: Variables inmunohistoquímicas utilizadas.

Tabla 10: Estadística descriptiva del conjunto de los pacientes.

Tabla 11: Significación estadística de las variables categóricas al comparar los grupos metastásicos y no metastásicos.

Tabla 12: Significación estadística de las variables categóricas con varias categorías al comparar los grupos metastásico y no metastásico.

Tabla 13: Comparación de las poblaciones linfocitarias de los grupos metastásicos y no metastásicos.

Tabla 14: Significación de las variables estudiadas mediante inmunohistoquímica incluyendo como variable el índice de Breslow.

Tabla 15: Comparación de edad en función de las poblaciones linfocitarias.



**ABREVIATURAS:**

AET: antígeno específico de tumor.

AAT: antígenos asociados a tumor.

APC: célula presentadora de antígeno.

BANS: Back, arm, neck, scalp.

BGC: Biopsia ganglio centinela.

CPA: células presentadora de antígeno.

CTLA4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

FGF2: factor de crecimiento fibroblástico 2.

FOXP3: proteína de caja forkhead 3.

GZMB: granzima B.

H-E: hematoxilina –eosina.

IHQ: inmunohistoquímica.

IL-8: interleuquina 8.

ILV: invasión linfovascular.

IM: índice mitótico.

LB: linfocitos B.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LTC: linfocitos T citotóxicos.

LT h: linfocitos T helper.

LTreg: linfocitos T reguladores.

LVD: linfovascultura.

MAPK: MAP kinasas.

MHC: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

MMPs: metaloproteinasas de la matriz.

MVD: microvasculatura.

NK: natural Killer.

NKG2D: miembro D del grupo 2 de los receptores en las células NK.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGE2: prostaglandina E2.

PD1: muerte celular programada 1.

PD-L1: ligando del receptor de muerte celular programada 1.

RUV: radiación ultravioleta.

SEER: programa de vigilancia, seguimiento y resultados finales de estados unidos.

TGF a: factor de crecimiento transformante alpha.

TGF-b: factor de crecimiento transformante beta.

TIL: linfocitos infiltrantes del tumor.

TMA: *Tissue Micro Arrays*.

TNM: Tumor, nodes, metastases.

Treg: linfocitos T reguladores.

uPA: Uroquinasa activadora del plasminógeno.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

# **1.INTRODUCCIÓN**

El melanoma es un tumor derivado de los melanocitos. A pesar de que representa un 2- 3% de todos los tumores malignos de piel, supone la causa más frecuente de muerte por cáncer cutáneo <sup>1</sup>.

En los últimos años se ha incrementado su incidencia, no así su mortalidad, probablemente debido a un diagnóstico más precoz y en estadios iniciales. Se estima que la incidencia se ha incrementado un 3-7% cada año durante los últimos 50 años en la raza blanca. Su incidencia aumenta a un ritmo mayor que el de la mayoría de los tumores sólidos, siendo un tumor potencialmente muy agresivo que afecta a una población cada vez más joven <sup>2</sup>.

Los últimos hallazgos en la genética, la inmunología y el tratamiento de melanoma hacen que haya pasado de ser un tumor con mal pronóstico cuando es invasivo a una prolongación significativa de la esperanza de vida de estos pacientes.

Por todo ello la investigación en este tumor continua siendo de vital importancia en el momento actual.

### **1.1 Historia del melanoma**

La primera referencia histórica del melanoma la encontramos en los escritos de Hipócrates que los describe como “tumores fatales negros con metástasis” <sup>3</sup>.

La primera descripción científica detallada del melanoma se atribuye a René Laennec quien describe “la melanososis” en la Facultad de Medicina de París <sup>4</sup>.

El término de melanoma es utilizado por primera vez por Robert Carswell en 1838 y en 1890, Jonathan Hutchinson describe el léntigo maligno <sup>5</sup>. En 1820 Norris publica una posible predisposición familiar a desarrollar melanoma, hoy se sabe que aproximadamente un 10% de los melanomas surgen en un contexto familiar.

Hace 30 años empiezan a desarrollarse los estudios genéticos de susceptibilidad al melanoma <sup>6</sup>.

El artículo de Bastian BC y cols <sup>7</sup> ha cambiado nuestra forma de ver y abordar a los pacientes: estamos en la era de la biología molecular. Desde 2003 los avances en genética y diagnóstico molecular son constantes.

## **1.2 Epidemiología del melanoma y factores de riesgo para el desarrollo del mismo:**

### **1.2.1 Incidencia:**

El melanoma representa aproximadamente el 1,5% de todos los tumores en ambos sexos.

En los últimos años hemos asistido a un incremento de la incidencia de este tumor que se supone relacionado con la mayor exposición solar y al consumo de actividades artificiales de bronceado. La tasa de incremento de incidencia de este tumor en la raza blanca se calcula que es un 3-7% anual <sup>8</sup>.

El melanoma es 10 veces más frecuente en personas de raza “caucásica” que en “afroamericana subsahariana” y en mujeres la prevalencia es mayor en grupos de edad más joven que en el caso de los hombres. En cambio, a partir de los 55 años existe un acusado aumento de la incidencia en hombres <sup>9</sup>.

En Europa, a diferencia del resto del mundo, es más frecuente en mujeres que en varones.

En España se diagnostican cada año aproximadamente 3200 casos nuevos, la mayoría entre los 40 y los 70 años, aunque el diagnóstico entre los 20-29 se incrementa cada año a razón de un 7%<sup>10</sup>. En el meta-análisis publicado en la revista *actas dermosifilográficas* en 2016 por A Tejera- Vaquerizo y cols <sup>10</sup> citan una tasa de incidencia de 8,82 (IC 95%: 7,59-10,04)/100.000 personas-año. La tasa de incidencia estandarizada es baja en comparación con otros países europeos, y refleja la diferencia en Europa tanto en el eje Norte/Sur como Este/Oeste, que oscila entre los 6 casos por 100.000 personas-año para el Este europeo, los 10 casos para el Sur de Europa y hasta los 19 casos por 100.000 personas-año en el Norte de Europa.

La tasa de mortalidad por melanoma fue de 2,17 (IC 95%: 1,78-2,55) por 100.000 personas-año para los estudios basados en diagnósticos histológicos en Navarra, Gerona y Tarragona entre 2000-2015. Estos autores señalan que aunque esta tasa es baja, es posible que siga aumentando en los próximos años, sobre todo en las personas de mayor edad, a diferencia de otros países europeos nórdicos, donde se ha registrado una estabilización o incluso un descenso en la mortalidad <sup>10</sup>. Otros estudios observan que a pesar del aumento de casos la mortalidad permanece estable, posiblemente por un diagnóstico más precoz y los avances en el tratamiento <sup>11</sup>.

Es una de las neoplasias que provoca una mayor cantidad de años de vida potencialmente perdidos, muertes prematuras y elevada morbilidad.

### **1.2.2 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo para el desarrollo del melanoma incluyen una combinación de predisposición del individuo y factores ambientales

#### **1.2.2.1. Radiación ultravioleta:**

La exposición a la radiación ultravioleta ha demostrado ser un factor de riesgo fundamental para el desarrollo del melanoma cutáneo. Armstrong y Kricker consideran que hasta un 60% de los melanomas cutáneos son debidos a la exposición solar <sup>12</sup>.

Las fuentes de exposición solar artificial como las cabinas de bronceado también son una fuente de exposición a radiación ultravioleta y están consideradas como carcinógeno de primer grado <sup>13</sup>. En algunos países hay una legislación restrictiva, algunas agencias sanitarias como la francesa han solicitado su prohibición por su alto riesgo carcinogénico.

La exposición solar aguda e intermitente tiene mayor influencia en el desarrollo de la forma más frecuente de melanoma que la crónica <sup>14</sup>. La relación entre la radiación ultravioleta y el melanoma cutáneo difiere con la de las queratosis actínicas y el carcinoma epidermoide. En general la edad media de aparición de los melanomas es menor que en este otro grupo de tumores que se relacionan con exposición solar crónica.

#### **1.2.2.2 Geografía:**

Está bien descrita la relación entre latitud e incidencia de melanoma. Las incidencias más altas ocurren en países con latitudes más bajas, es decir aquellos que están más cercanos al ecuador donde existe una mayor intensidad de radiación ultravioleta <sup>16</sup>. Esto se puede observar bien en Estados Unidos y en Australia, de hecho este último es el país con mayor incidencia de melanoma (aproximadamente 50 casos al año por 100.000 habitantes), lo cual vendría explicado porque en esas latitudes hay una exposición solar muy intensa a la que no estaría adaptada la piel del inmigrante caucásico <sup>15</sup>.

#### **1.2.2.3 Fototipo:**

Fitzpatrick <sup>17</sup> clasifica los fenotipos cutáneos en 6 grupos:

Fototipo I: piel blanca que con la exposición solar siempre se quema y nunca se broncea.

Fototipo II: piel blanca, la exposición solar casi siempre quema y produce un mínimo bronceado.

Fototipo III: piel blanca, la exposición solar produce quemaduras y bronceado.

Fototipo IV: piel blanca, la exposición solar no produce quemaduras, produce bronceado.

Fototipo V: piel parda en la que la exposición solar no produce quemaduras, sí produce bronceado.

Fototipo VI: piel negra, individuos que nunca se queman.

La incidencia de melanoma es mayor en pacientes con fototipos I y II, en general son individuos con antecedentes de exposición solar aguda intermitente y los tipos más frecuentes de melanoma son el melanoma de extensión superficial seguido del melanoma nodular.

En los pacientes de piel negra, cuando desarrollan melanomas, estos se localizan con más frecuencia en zonas no expuestas al sol (palmas, plantas, mucosas y ojos) y no presentan las variantes de extensión superficial, siendo más frecuentes los melanomas acrales <sup>18</sup>.

#### 1.2.2.4 Antecedentes familiares:

Se encuentran antecedentes familiares de primer grado de melanoma en aproximadamente un 10% de los pacientes. En algunas de estas familias se han encontrado mutaciones del gen supresor de tumores CDKN2A/ CDK4/MC1R <sup>19</sup>.

Los recientes avances tecnológicos han permitido identificar nuevos genes implicados en la susceptibilidad al melanoma como: BRCA1 (cáncer de mama), proteína 1 asociada a BCRA (BAP1) y gen TERT (transcriptasa telomerasa inversa).

Estos pacientes también tienen un riesgo elevado de desarrollar otras neoplasias en órganos internos, especialmente de cáncer pancreático y es esencial que tengan un manejo y seguimiento adecuado.

Por tanto, es importante en el melanoma el consejo genético/estudio genético <sup>20</sup> especialmente si existen melanomas múltiples o melanomas familiares.

Asimismo, se sabe que una vez que se ha tenido un melanoma, se tiene más riesgo de desarrollar un segundo y un tercer melanoma. Un 5-10 % de los pacientes afectos de un melanoma desarrollaran un segundo melanoma en un periodo medio de 3 años. Las personas de género masculino de edad avanzada y piel blanca son los que tienen más riesgo de melanoma múltiple.

Numerosos estudios señalan que los melanomas subsecuentes tienden a ser con más frecuencia melanomas *in situ* o de menor grosor que los melanomas diagnosticados en primer lugar. Los subtipos histológicos más frecuentes son el melanoma de extensión superficial y el léntigo maligno melanoma <sup>21</sup>.

#### 1.2.2.5 Número de nevus comunes, nevus congénitos y nevus displásicos o atípicos:

El hecho de desarrollar nevus melanocíticos adquiridos es muy frecuente. Son nevus que aparecen en la primera infancia, aumentan de tamaño y número en la juventud y tienden a desaparecer a partir de los 50 años. El número de nevus adquiridos que tendrá un individuo viene determinado por la genética y por la exposición solar en la infancia antes de los 8 años. Se estima que del 20-51% de los casos de melanoma están asociados a nevus, aunque este es un tema controvertido y hay autores que afirman que el 100% de los melanomas está asociado a un nevo previo <sup>22</sup>.

El riesgo de desarrollar melanoma se incrementa según el número de nevus preexistentes y es de 2-7 veces mayor en personas con más de 50 nevus adquiridos, fundamentalmente si existen nevus atípicos <sup>23</sup>.

Los nevus congénitos, aquellos que están presentes en el nacimiento o se desarrollan poco después de nacer, se clasifican según su tamaño en pequeños, medianos y gigantes (>20 cms). Estos últimos son los que tienen más riesgo de desarrollar un melanoma y melanosis neurocutánea en los primeros 5 años de vida. El riesgo estimado de desarrollo de melanoma sobre los nevus congénitos es de un 1-2% cuando son grandes o gigantes <sup>24,25</sup>.

Los nevus displásicos, tienen una incidencia en la población de entre un 5-15%, estos pacientes tienen un riesgo relativo de hasta 10 veces de desarrollar un melanoma en comparación con la población normal <sup>26</sup>.



#### 1.2.2.6 Edad:

La edad avanzada se ha relacionado con un incremento en la incidencia de melanoma así como con una mayor mortalidad asociada. Los melanomas en pacientes ancianos tienen peor pronóstico<sup>27</sup>. Pese a que los melanomas en el anciano suponen el 40% de los melanomas diagnosticados, acaban provocando el 60,2 % de muertes por la enfermedad <sup>28</sup>.

El registro epidemiológico más amplio que existe actualmente es el programa de vigilancia, seguimiento y resultados finales de Estados Unidos (SEER) y registró en 2015 una incidencia de 101,7/100000 habitantes para los mayores de 65 años y alcanzaba los 114,7 casos por 100.000 habitantes para los mayores de 75 años, con un incremento porcentual más rápido para los varones mayores de 65 años <sup>29</sup>. Los datos de este registro mostraban además que la tasa de melanomas gruesos es significativamente más alta en estos pacientes y el grupo con mayor tasa de muerte por melanoma fue entre los 75 y los 84 años de edad.

Con la edad el sistema inmunitario cambia con una menor capacidad de defensa frente a las infecciones y los tumores. En el anciano existe una serie de desequilibrios entre los componentes efector y regulador de la respuesta inmunitaria, lo que se conoce como inmunosenescencia. Esto se produce por la estimulación antigénica crónica a lo largo de la vida por estrés oxidativo <sup>30</sup>. El aumento de citoquinas pro inflamatorias debido a la estimulación antigénica crónica induce un aumento de respuesta Th1 y la muerte de células tumorales.

Los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) se consideran una variable de buen pronóstico relacionados con la respuesta inmunitaria del huésped. Weiss y cols observaron que la intensidad del TIL se correlacionaba de forma positiva con la supervivencia y este efecto parece ser mayor en las personas de más de 45 años <sup>31</sup>.

#### 1.2.2.7 Inmunosupresión o alteraciones genéticas que producen un defecto en la reparación del ADN:

Las personas que presentan algún tipo de inmunosupresión tienen mayor riesgo de desarrollar melanoma. Entre los factores de inmunosupresión cabe destacar los tratamientos prolongados con UVA que incrementan el riesgo de melanoma en los 15 años posteriores.

### 1.3 Tipos histológicos o formas clínicas clásicas del melanoma:

Clark clasificó el melanoma en tres tipos fundamentales <sup>32</sup>.

- Léntigo maligno/léntigo maligno melanoma (LM/LMM)
- Melanoma de extensión superficial (MES)
- Melanoma nodular (MN)

Y posteriormente RJ Reed describió en 1997 las formas de melanoma acral y de mucosas <sup>33</sup>.

Esta clasificación cada vez tiene menor importancia debido a un mayor conocimiento en la genética molecular del tumor, pero es útil conocerla porque es la que han utilizado y utilizan todavía los patólogos en sus informes, y la hemos tenido en cuenta a la hora de revisión de las historias clínicas.

#### 1.3.1 Léntigo maligno y léntigo maligno melanoma (LM/LMM):

El léntigo maligno es una variante *in situ* del léntigo maligno melanoma (cuando atraviesa membrana epidérmica y tiene capacidad metastásica). Supone el 79-83% de los melanomas *in situ* y se caracteriza por afectar a pacientes de edad avanzada y asentarse en zonas de exposición solar crónica <sup>34</sup>. Su incidencia máxima se produce entre los 65-80 años y se está incrementando en los últimos años.

El LM/LMM supone un 5-15% de todos los melanomas y la localización más frecuente es en cabeza y cuello <sup>35</sup>.

El LMM tiene una fase de crecimiento radial muy larga (fase *in situ*) que puede durar décadas, antes de que evolucione a la fase invasora.

Clínicamente se presenta como una mácula o mancha de bordes y colores irregulares de crecimiento asimétrico de crecimiento muy lento, a lo largo de años <sup>36</sup>.

No se sabe qué porcentaje de LM va a evolucionar a LMM y no existe actualmente ningún criterio clínico, histológico, dermatoscópico o molecular que permita predecir esta evolución. Se ha descrito que el componente invasor es más frecuente en las lesiones más grandes. Una vez que progresa a LMM, el pronóstico es similar a otros melanomas invasivos <sup>37</sup>.

La histología sigue siendo el “*gold estándar*” para realizar el diagnóstico del LM en la que se encuentra una proliferación de melanocitos atípicos localizados a lo largo de la unión

dermoepidérmica y se describe la distribución perpendicular de los melanocitos y la afectación del epitelio perianexial. Se trata de un diagnóstico histológico difícil, ya que hay que diferenciarlo de la hiperplasia melanocítica que se produce en zonas de daño actínico crónico

<sup>38</sup>.

Lo ideal es realizar una biopsia escisional, pero en muchas ocasiones no es posible por el tamaño de la lesión y se realizan biopsias *punch* que pueden llevar a errores diagnósticos.

Por ello es importante complementar el diagnóstico clínico con el uso de la dermatoscopia, Según Schiffner y cols y Stolz y cols, la dermatoscopia permite el diagnóstico precoz del LM con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 96% <sup>39</sup>. Ayuda a la realización de la biopsia del área más sospechosa.

El diagnóstico diferencial tanto clínico, dermatoscópico como histológico tiene que realizarse con otras lesiones pigmentadas como: léntigos solares (LS), queratosis actínicas pigmentadas (QAP), queratosis seborreicas (QS), queratosis liquenoides benignas (QLB), diagnóstico que es complicado. En estos casos puede ser de utilidad el uso de la microscopia confocal <sup>40</sup>.

Las tasas de recidiva varían del 3 al 50% según el tratamiento, correspondiendo el 3% a las recidivas después de una escisión controlada al microscopio y el 50-100% a aquellos LM tratados mediante técnicas no quirúrgicas.

En cuanto al tratamiento, no existen guías específicas para el manejo de estos pacientes. El tratamiento quirúrgico es de elección cuando es posible. Se recomienda extirpar los melanomas con un margen de seguridad de piel sana en función del nivel de Breslow. Así, está protocolizado un margen de 0,5cm para un melanoma *in situ* o un LM, pero hay estudios que señalan que estos márgenes pueden ser insuficientes, por lo que la mejor técnica actualmente es la cirugía de Mohs con la que se obtienen tasas de curación de hasta el 97% <sup>41</sup>.

Dadas las características de los pacientes con LM/LMM, pacientes de edad avanzada con lesiones muy grandes, en ocasiones se utilizan métodos no quirúrgicos (crioterapia, radioterapia, imiquimod, láser) que tienen la ventaja de ser procedimientos no invasivos con buenos resultados cosméticos y baja morbilidad, pero la desventaja de las altas tasas de recidiva. Algunos autores describen la radioterapia como la mejor alternativa a la cirugía en estos pacientes <sup>42</sup>.

### **1.3.2 Melanoma de extensión superficial:**

Es la forma más frecuente de melanoma en la raza caucásica y supone aproximadamente un 50-70% de todos los melanomas. Más frecuente en extremidades inferiores en las mujeres y en espalda en los varones, se estima que aparece sobre una lesión melanocítica previa en aproximadamente el 40-50% de los casos <sup>43</sup>. Clínicamente se presenta como una lesión plana, asimétrica, con variaciones en el color, zonas más hipercromicas y zonas más acrómicas secundarias a un proceso de regresión. La fase de crecimiento radial dura entre varios meses y 4-5 años antes de iniciarse la fase de invasión o de crecimiento vertical que se manifiesta como aparición de lesiones nodulares sobre la misma <sup>44</sup>.

En la fase de crecimiento radial histológicamente se observa una proliferación de melanocitos atípicos con extensión pagetoide en la epidermis, mientras que en la de crecimiento vertical los melanocitos neoplásicos invaden la dermis papilar y se extienden en profundidad <sup>44</sup>.

### **1.3.3 Melanoma nodular:**

Se trata del segundo tipo más frecuente de melanoma y supone un 10-30% de los mismos. Afecta a cualquier grupo de edad y las localizaciones más frecuentes son en tronco, cabeza y cuello. Clínicamente se manifiesta como una lesión homogénea de 1 a 2 cm con crecimiento rápido en varios meses. La ulceración es frecuente. Un 5% aproximadamente son amelanóticos y clínicamente son difíciles de diferenciar de otras lesiones como los hemangiomas o los granulomas piogénicos <sup>43</sup>.

Histológicamente se define porque no presenta una fase de crecimiento radial, sino que directamente tiene una fase de invasión o de crecimiento vertical. Esto hace que se trate de la forma clínica con mayor agresividad y capacidad de metastatizar. Se trata de una lesión fundamentalmente dérmica aunque se pueden ver células epidérmicas (sin visualizarse células del melanoma en epidermis es complicado el diagnóstico de melanoma primario). Se observan en dermis nidos de células epitelioides que no maduran. Las células tienen núcleos grandes, hipercromáticos con nucleolos agrandados, con citoplasmas amplios acidófilos con gránulos de melanina variables y el estroma presenta una inflamación variable con fibroplasia, telangiectasias y melanófagos <sup>44</sup>. En ocasiones son amelanóticos dificultando aún más el diagnóstico.

#### **1.3.4 Melanoma lentiginoso acral y melanoma de mucosas:**

El melanoma lentiginoso acral (MLA) es un subtipo de melanoma relativamente raro en raza blanca, ya que representa entre un 1-2% de todos los melanomas. No tiene relación aparente con la radiación solar, y se localiza en palmas, plantas y alrededor del aparato ungueal. Los MLA presentan en general un pronóstico desfavorable relacionado con varios factores, entre los que destacan la demora en el diagnóstico y probablemente la biología de este subtipo tumoral. Ambas circunstancias conducen a la detección del melanoma en un escenario negativo, con un elevado índice de Breslow, ulceración tumoral y metástasis loco-regionales.

El retraso del diagnóstico atribuible al paciente se produce por la edad avanzada de estas personas, el desconocimiento de la presentación clínica del MLA en la población general, y la dificultad de autoexploración de zonas ocultas y difícilmente accesibles que se acrecenta en la vejez <sup>45</sup>. Histológicamente se caracteriza por la presencia de melanocitos a lo largo de la unión dermoepidérmica con patrón lentiginoso y epidermis hiperplásica en la fase de crecimiento radial. Esta fase de crecimiento radial tiene una media de 2,5 años y posteriormente invade en profundidad en una fase de crecimiento vertical.

Estos tipos de melanomas comparten muchas características clínicas e histológicas con los melanomas de mucosas, que histológicamente también tienen un patrón de crecimiento lentiginoso y aparecen en zonas no expuestas al sol, por lo que parece que en estos casos el papel de la radiación ultravioleta jugaría un papel menor. Otra similitud es que en los melanomas lentiginosos acrales y en los melanomas de mucosas es infrecuente la asociación con nevo; según la bibliografía actual sólo un 10% de estos melanomas se asociarían a un nevo previo. En comparación con el 30-50% de los melanomas de extensión superficial <sup>46</sup>.

Además como se comentará en el siguiente apartado las mutaciones no relacionadas con la radiación UV son diferentes a las que se inducen por ésta.

#### **1.4 Clasificación genética/molecular actual:**

A la luz de los conocimientos actuales en genética se ha propuesto una clasificación genómica de los melanomas y, como veremos más adelante, el melanoma es uno de los tumores en los que se encuentra una variabilidad genética más elevada.

Con datos del proyecto del atlas genético del cáncer se clasificó el melanoma en 4 tipos genéticos: pacientes con mutaciones en BRAF, pacientes con mutaciones en NRAS, pacientes

con mutaciones en el gen NF-1, y pacientes en los que no se encuentra ninguna de las anteriores mutaciones (*Triple Wild Type*) <sup>47</sup>. Los diferentes subtipos genéticos pueden predecir la respuesta a distintos tratamientos actualmente disponibles.

Parece ser que la exposición a la RUV tiene mucho que ver en el tipo de mutación que se produce, así:

-Zonas con exposición crónica, tienen un alto número de mutaciones y de forma más frecuente mutaciones en NF-1, NRAS y en ocasiones en BRAF V600K. Por el contrario las mutaciones en BRAF V600E son muy infrecuentes <sup>48</sup>.

-Zonas de exposición solar intermitente, tienen un número intermedio de mutaciones y se localizan en BRAF V600E (50%) o en NRAS (15-20%).

- Zonas sin exposición solar (acral, uveal y de mucosas) tienen un número bajo de mutaciones y se encuentran en C-KIT y GNAQ/GNA11 entre otras.

La tabla 1 adjunta resume las mutaciones y su tipo en función de la exposición solar.

Tabla 1.- Resumen mutaciones en función de la exposición solar

Exposición solar	Número de mutaciones	Tipo de mutaciones
Crónica	Alto	NF-1, BRAF V600K
Intermitente	Intermedio	BRAF V600E, NRAS
Baja o Ausente	Bajo	C-KIT, GNAQ/GNA11

Se sabe que, en las formas más frecuentes de melanoma, la radiación ultravioleta es el principal iniciador de la mutagénesis. Numerosos estudios han demostrado la relación de la RUV con el desarrollo del melanoma. La RUV induce un firma mutacional (“huella solar”) característica con C>T y CC>TT <sup>49</sup>.

Además, parece que los precursores de melanoma progresan de una forma estereotipada en muchos casos. Así lesiones benignas (los nevus melanocíticos) tienen sólo mutaciones en BRAF V600E, lesiones de malignidad intermedia adquieren otras mutaciones como mutaciones en

TERT o NRAS y los melanomas invasivos con frecuencia adquieren pérdidas en CDKN2A, pérdidas de PTEN o mutaciones de p53.

Las mutaciones en BRAF V600E por sí solas son insuficientes para iniciar la oncogénesis y requieren de giros mutacionales adicionales, en este punto es donde la RUV muestra ser el mayor iniciador de la mutagénesis <sup>50</sup>.

## **1.5 Factores pronósticos en el melanoma**

Los factores histopatológicos continúan siendo los más importantes de cara al pronóstico.

### **1.5.1 Factores morfológicos:**

#### 1.5.1.1 Niveles de Clark e índice de Breslow:

Inicialmente se utilizaban los niveles de Clark (nivel I o melanoma *in situ*, nivel II con invasión de la dermis papilar por células aisladas o pequeños nidos de células, nivel III cuando el tumor invade y expande la dermis papilar y alcanza la unión dermis papilar y dermis reticular, nivel IV con infiltración franca de la dermis reticular y nivel V con infiltración del tejido celular subcutáneo) <sup>51</sup> pero a lo largo de los años se ha probado que el valor pronóstico de estos niveles era menos fiable por su mayor subjetividad que el índice de Breslow y numerosos estudios han demostrado que el nivel de Clark no es un factor pronóstico independiente ni siquiera en los melanomas finos <sup>52</sup>.

La determinación del grosor tumoral fue introducida por primera vez por Breslow en 1970 y se define como la distancia desde la parte superior de la capa granulosa del melanoma hasta la célula tumoral ubicada de forma más profunda, medida en milímetros <sup>53</sup>. El espesor tumoral se reconoce como el factor pronóstico más importante para el melanoma primario invasivo.

Basado en su publicación se propuso este esquema:

- 1.- <0.76 mm de grosor: melanomas de bajo riesgo, rara vez metastatizan.
- 2.-0.76-1,5mm: melanomas de riesgo intermedio bajo.
- 3.-1,5-4 mm: melanomas de riesgo intermedio alto.
4. - >4mm: melanomas de alto riesgo.

En un estudio de 1996 de Barnhill RL y cols <sup>54</sup> los pacientes con un grosor menor a 0,76 mm tenían una supervivencia a los 5 años del 97,9%, los pacientes con un grosor entre 0,76-1,69

mm de grosor tenían una supervivencia a los 5 años de un 91,7%, un 72.8% los pacientes con melanomas entre 1,7-3,6 mm y un 57,5% para los melanomas de >3,6 mm.

El sistema de estadificación Americano (AJCC) toma los puntos de corte de 1 mm, 2 mm y 4 mm porque no hay umbrales distinguibles a medida que aumenta el tumor y estos puntos de corte son más convenientes <sup>55</sup>. Los melanomas que tienen un grosor de 1 mm o menos se clasifican como melanomas finos y tienen un pronóstico favorable, mientras que los melanomas de más de 4 mm se denominan melanomas gruesos y tienen un pronóstico desfavorable. Los estudios muestran una elevada correlación entre el grosor del melanoma y la supervivencia a 10 años <sup>56</sup>. En el estudio en el que se basan las recomendaciones de la AJCC de 2009 para estadificación del melanoma, la supervivencia a 10 años para 11,841 pacientes con melanomas finos (<1 mm) era del 92%, la supervivencia a 10 años de los 8046 pacientes con melanomas de 1,01-2mm fue del 80%, para los 5291 con melanomas de 2,01-4 mm la supervivencia a 10 años fue del 63% y para los 2461 pacientes con melanomas de más de 4 mm fue del 50% <sup>56</sup>.

#### 1.5.1.2 Ulceración:

La asociación negativa entre la presencia de ulceración histológica en el melanoma y un peor pronóstico ha sido muy estudiada <sup>57</sup>.

Se define la ulceración como una pérdida de la continuidad del epitelio (una ausencia de epidermis intacta) sobre una porción de melanoma primario <sup>58</sup>.

Se trata de un factor pronóstico fácil de reproducir, y la incidencia de ulceración se eleva a medida que se incrementa el grosor tumoral. La presencia de ulceración disminuye la supervivencia para todos los espesores tumorales.

En el estudio publicado por Barnhill y cols <sup>54</sup> la supervivencia a los 5 años en pacientes con ulceración fue del 66,2% en comparación con el 91,6% de los pacientes que tenían melanomas no ulcerados.

La ulceración es un factor pronóstico que no ha dejado de aparecer en los sucesivos sistemas de estadificación del melanoma hasta el momento actual, siendo la última AJCC del año 2018 <sup>60</sup> y su presencia o ausencia en el melanoma primario era el segundo factor pronóstico más importante de supervivencia para el análisis de la AJCC de 2002 y el tercero para el de 2010. Como hemos señalado, los tumores gruesos están ulcerados con más frecuencia: la incidencia



de ulceración en los melanomas gruesos fue del 63% en comparación con el 6% de los melanomas finos <sup>59</sup>. Sin embargo, la presencia de ulceración es un factor pronóstico independiente del grosor tumoral. Los pacientes que tienen melanomas ulcerados tienen el doble de riesgo de morir de melanoma que los pacientes que no tienen melanomas ulcerados.

Curiosamente la presencia de ulceración disminuye las tasas de supervivencia al mismo nivel que para los pacientes con melanomas no ulcerados del siguiente grupo de mayor grosor. La supervivencia a los 5 años en el caso de los melanomas de entre 2.01-4 mm y no ulcerados fue del 79%, similar a la tasa del 82% de los melanomas de entre 1,01- 2 mm pero ulcerados, por lo tanto ambos se incluyeron en el estadio II A de la AJCC <sup>56</sup>.

#### 1.5.1.3 Índice mitótico:

El índice mitótico es una medida de proliferación del tumor primario que puede ser analizado de forma sencilla durante el estudio anatomopatológico de la muestra.

Se tiende a valorar la densidad mitótica /mm<sup>2</sup> en el corte histológico, lo que tiene la limitación de la variabilidad en las diferentes áreas tumorales <sup>61</sup>.

Actualmente se informa de la tasa mitótica dérmica en la fase de crecimiento vertical del tumor como el número de mitosis por mm<sup>2</sup>. En un primer momento se identifica el área del tumor con mayor actividad mitótica o el punto caliente y luego se cuentan las mitosis en un área de al menos 1 mm<sup>2</sup> <sup>62</sup>.

A veces las mitosis se encuentran dispersas y no se puede identificar un punto caliente, en estos casos se toma un área de 1 mm<sup>2</sup> alrededor de una mitosis representativa y el resultado se expresa como el número de mitosis /mm<sup>2</sup>. Si la zona invasora del melanoma es inferior a 1 mm<sup>2</sup> la tasa mitótica es de al menos 1 mm<sup>2</sup> o 0 mm<sup>2</sup> <sup>63,64</sup>.

La supervivencia disminuye a medida que se incrementa el número de mitosis y muchos trabajos citan que el índice mitótico predice la supervivencia <sup>65</sup>.

En una población base, la supervivencia a los 5 años para los pacientes con 0 mitosis /mm<sup>2</sup> fue del 98.7% en comparación con el 85,1% para aquellos que tenían un índice mitótico entre 1 y 6 /mm<sup>2</sup>. En este mismo estudio los pacientes con más de 6 mitosis por mm<sup>2</sup> tenían una supervivencia a los 5 años de un 68,2% <sup>54</sup>.

Estos resultados se han repetido en estudios más recientes, por ejemplo en el estudio publicado por Thomson y cols. en el que se incluyen 10233 pacientes con melanoma localizado, con análisis multivariante encontraron que la supervivencia a 10 años variaba de un 93% en los pacientes que tenían 0 mitosis por/mm<sup>2</sup> a un 48% para aquellos con 20 mitosis por mm<sup>2</sup>. El grosor tumoral, el índice mitótico y la ulceración fueron los factores más potentes a la hora de predecir la supervivencia <sup>65</sup>.

Debido a estos resultados en la 7ª edición de la AJCC se incluyeron las mitosis en la estadificación de los tumores T1 <sup>66</sup>, sin embargo la influencia de las metástasis en el pronóstico del melanoma se demostraba importante no sólo en los melanomas finos (menos de 1mm de espesor) sino en general en los melanomas localizados. Otros trabajos posteriores demostraron su valor pronóstico en melanomas de más de 1 mm de espesor y como factor predictor de biopsia selectiva de ganglio centinela positivo lo que reducía su especificidad en el pronóstico de los melanomas finos <sup>67</sup>.

Por otra parte, se planteó la variabilidad entre observadores y la baja reproducibilidad del índice mitótico, lo que evidenció la necesidad de hacer 3-5 cortes seriados para que se considerara fiable la evaluación de las mitosis, proponiéndose que podía no ser un buen parámetro para tomar decisiones terapéuticas <sup>68</sup>.

Por ello en la octava edición de la AJCC <sup>60</sup> desaparece la influencia de las mitosis para clasificar los tumores T1 y se centra exclusivamente en el espesor y la presencia de ulceración.

#### 1.5.1.4 Satelitos:

La satelitos microscópica se define como la presencia de agregados tumorales en la dermis reticular, en tejido celular subcutáneo o en vasos, que se encuentran separados de la parte principal del tumor por tejido sano y miden más de 0,05 mm de diámetro <sup>69</sup>.

La satelitos representa extensión local tumoral o micrometástasis y tiene valor pronóstico, de tal manera que pacientes en estadio I con satelitos tienen una supervivencia a los 5 años del 36% en comparación con los que no tienen satelitos que tienen una supervivencia del 89%. Además, los pacientes que tienen satelitos tienen una incidencia de metástasis ganglionares mayor que los que no la tienen (53 % vs 12%). Ocurre lo mismo con las metástasis viscerales y óseas <sup>70</sup>.

#### 1.5.1.5 Presencia de infiltrado inflamatorio acompañante:

La respuesta inmune a los tumores sólidos entre los que se encuentra el melanoma está cobrando cada vez más importancia por las implicaciones pronósticas que tiene y los posibles tratamientos inmunodirigidos. La forma de estudiar esta respuesta inmune es muy variada y una forma de hacerlo es mediante el estudio del infiltrado inflamatorio asociado a los mismos.

El infiltrado inflamatorio en los tumores fue descrito por primera vez por Virchow en 1863 y se pensaba entonces que el cáncer se originaba en sitios de inflamación crónica y el tumor crecía debido a este proceso inflamatorio <sup>71</sup>.

Sin embargo, pronto se observó que no era que el infiltrado inflamatorio fuera el origen del cáncer sino al contrario, las células del sistema inmunitario del huésped aparecían como un mecanismo de defensa frente al tumor y su presencia se relacionaba con un mejor pronóstico <sup>72</sup>.

En el caso del melanoma, el estudio del infiltrado inflamatorio se lleva realizando desde hace años y es bien conocida su importancia pronóstica y como marcador de respuesta a los nuevos tratamientos inmunoterápicos.

##### 1.5.1.5.1 Clasificación del infiltrado inflamatorio tumoral (TIL):

Los estudios iniciales del infiltrado inflamatorio en el melanoma (TIL) de Clark y colaboradores establecían criterios basados exclusivamente en los estudios de H-E <sup>73</sup> y lo describían como:

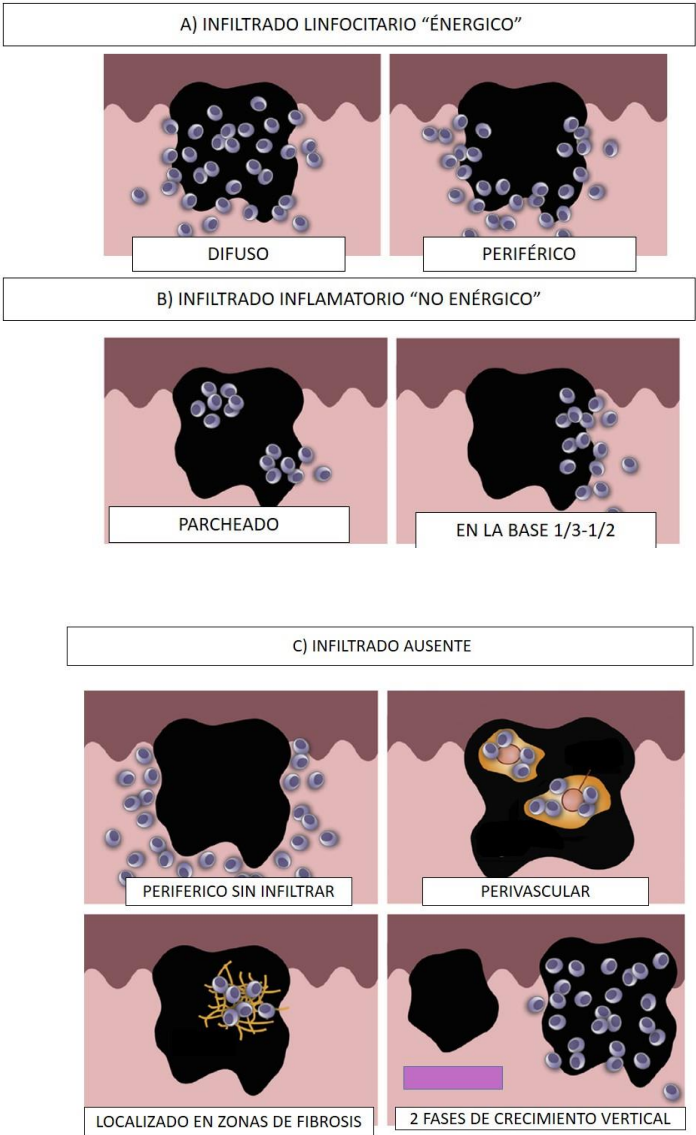
- Intenso: presente en toda la fase de crecimiento vertical o en la base de la fase de crecimiento vertical.
- No intenso: infiltrado inflamatorio en uno o más focos de la fase de crecimiento vertical.
- Ausente: completamente ausente o presente pero sin infiltrarse en los nidos del melanoma.

La clasificación del infiltrado inflamatorio siguiendo este sistema de Clark <sup>73</sup> demostró ser un factor pronóstico independiente de supervivencia global con una OR de 11,3 para un infiltrado intenso y una OR 3,5 para un infiltrado no intenso. Este estudio establecía unos criterios muy estrictos para definir el infiltrado inflamatorio asociado al tumor y es que los linfocitos debían infiltrar los nidos del melanoma y los linfocitos del estroma no se incluían.

Mihm y cols <sup>74</sup> basándose en estas definiciones propusieron que los 2 patrones principales de intenso debían llamarse periférico y difuso respectivamente. Insistían en que este término

debía reservarse para los casos en los cuales los linfocitos se intercalan difusamente entre las células tumorales rodeándolas e interrumpiéndolas con evidencia de necrosis en el melanoma circundante (Fig A). Estos autores recalcan que el patrón no intenso incluye la infiltración de linfocitos parcheada a lo largo de la fase de crecimiento vertical del melanoma y el infiltrado que ocupa de un tercio a la mitad de la base en la fase de crecimiento vertical (Fig B) y señalan que otros patrones como una densa banda de linfocitos alrededor de la fase de crecimiento vertical o infiltrado confinado a zonas de necrosis debía considerarse como ausente (Fig C).

Figura 1: Clasificación TIL, modificada de Mihm y cols <sup>74</sup>.



El sistema de clasificación de Clark es el más utilizado posiblemente por su fácil comprensión y por su reproducibilidad.

En un estudio publicado en 2001 en el que participaban 6 observadores 3 patólogos y 3 dermatólogos publicaban una buena tasa de acuerdo inter-observador ( $Kappa > 0,6$ )<sup>75</sup>.

En 2012 el grupo del instituto del melanoma de Australia<sup>76</sup> proponía un sistema modificado del propuesto por Clark, y lo clasificaba en función de la densidad (ausente /leve /moderada /marcada, puntuación de 0-3) y la distribución (ausente /focal/multifocal/ difusa, puntuación 0-3) y en función de las distintas puntuaciones definía el TIL en 4 grados:

Grado 0= ausente.

Grado 1 =infiltrado focal leve o moderado, o infiltrado multifocal leve.

Grado 2 = marcado focal, moderado o marcado multifocal, o leve difuso.

Grado 3 = infiltrado moderado o marcado difuso.

Sin embargo, otros estudios más recientes como el de 2015 de Eriksson y cols<sup>77</sup> en aproximadamente 4000 pacientes con un sistema de evaluación del TIL similar al de Clark, no encuentran que sea un factor pronóstico independiente. Las discrepancias pueden deberse a las distintas poblaciones estudiadas, al distinto grosor de melanoma y/o la distinta fase de crecimiento del tumor. Parece que en los estudios que incluyen un mayor número de melanomas finos en los que sólo hay fase de crecimiento radial no se encuentra una asociación entre el TIL y la supervivencia<sup>78</sup>.

1.5.1.5.2 Inmunobiología del infiltrado inflamatorio tumoral y escape inmunológico del melanoma:

La composición del TIL es heterogénea y engloba no solamente linfocitos T reguladores (Treg) sino otras muchas células como linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células *natural Killer* (NK), macrófagos, células dendríticas y células supresoras derivadas de la médula ósea, entre otras.

El conocimiento del fenotipo y función de estas células es imprescindible para el estudio del microambiente tumoral y los posibles tratamientos dirigidos a estos.

Todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). Estas proteínas están implicadas en la presentación de antígenos citosólicos a los linfocitos T, incluyendo a los linfocitos T citotóxicos. Cuando antígenos tumorales extraños son presentados en las MHC I, estas células pueden ser

reconocidas y destruidas por los linfocitos T citotóxicos. Por el contrario las MHC tipo II son expresadas sólo en células presentadoras de antígenos (CPAs) <sup>79</sup>.

La activación del infiltrado inflamatorio tumoral no sólo requiere de la unión de las MHC I o II al receptor de células T (TCR) sino que también necesita de la estimulación simultánea de una señal co-estimuladora por la interacción de la célula T con la APC que lleva a la activación completa de la célula T y la expansión clonal de LT con especificidad frente a un determinado tumor. Además, la célula T puede ser regulada de forma negativa por moléculas inhibitorias denominadas “*check points*” o puntos de control <sup>80</sup>.

Los antígenos tumorales se clasifican en 2 grupos, por un lado los antígenos específicos de tumor (AET) que solamente se expresan en las células tumorales y por otro lado los antígenos asociados al tumor (AAT) que se expresan de forma mayoritaria en las células tumorales pero que también pueden expresarse en células normales del organismo <sup>81</sup>

Los AET son “neoantígenos” con mutaciones propias que no se encuentran en el genoma normal. Estos neoantígenos en teoría tienen una mayor inmunogenicidad porque las células T que van dirigidas a estas moléculas no se ven afectadas por la tolerancia central. Estudios recientes sugieren que los neoantígenos son los responsables de las respuestas a los nuevos tratamientos inmunológicos como los anti CTLA4 o anti PD1 <sup>82</sup>.

A pesar de los mecanismos de nuestro sistema inmune para protegernos del cáncer, éste es capaz de progresar y lo hace a través de múltiples mecanismos que son capaces de evitar la respuesta inmunológica, entre ellos los más estudiados hasta el momento son:

1.-Regulación a la baja de los antígenos asociados a tumor (AAT), lo que disminuye el reconocimiento de las células tumorales por los LTCs. Hay estudios que muestran que estos se encuentran disminuidos en los melanomas metastásicos y en los melanomas recurrentes <sup>83</sup>.

2.- Disminución de la expresión de MHC I, lo cual disminuye el reconocimiento por los LTCs y las células NK.

3.-Disminución de la expresión de ligandos de células NK como MICA o MICB.

4.- Inhibición de la actividad de las células NK mediante la expresión de miembro D del grupo 2 de los receptores en las células NK (NKG2D) <sup>84</sup>.

5.- Expresión de FAS ligando en las células del melanoma y utilización de esta vía para inducir apoptosis de los LT <sup>85</sup>.

6.- Secreción de moléculas de señalización inhibitorias, por ejemplo citoquinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformante b (TGF-b) y la prostaglandina E2 (PGE2) <sup>86</sup>

7.-Induciendo una disfunción a las CPA que no son capaces de presentar los AET a las células T <sup>87</sup>

8.-Las propias células del melanoma pueden actuar como CPA con la capacidad de expresar MHC II en su superficie y de esta manera provocar que los LT no respondan por ausencia de co-estimulación del TCR <sup>88</sup>.

9.-Las células del melanoma pueden expresar co-inhibidores como PD-L1 que se une a su receptor PD -1 en la célula T y de esta manera evitar la lisis celular mediada por LT <sup>89</sup>.

10.- El melanoma puede reclutar células del sistema inmune que inducen tolerancia como células CD4+, CD25+, cels Treguladoras Foxp3+ <sup>90</sup>.

#### 1.5.1.5.3 Inmunohistoquímica (IHQ) en el TIL:

Los estudios mediante IHQ para definir y cuantificar el tipo de infiltrado inflamatorio ayudan a mostrar la respuesta del paciente en la respuesta al melanoma.

Linfocitos CD69+ <sup>91</sup>, linfocitos B CD 20+ <sup>92</sup> y linfocitos citotóxicos identificados mediante granzima+ <sup>93</sup> han demostrado correlacionarse con un incremento en la supervivencia. Al contrario, los linfocitos T reg FOXP3 + tienen un impacto negativo en la supervivencia <sup>94</sup>.

#### 1.5.1.5.4 Correlación del infiltrado inflamatorio tumoral con la afectación ganglionar:

Hay estudios que demuestran que el infiltrado inflamatorio en el tumor primario se correlaciona de forma inversa con la afectación ganglionar. Esto se ha probado tanto utilizando el sistema de clasificación de Clark como el modificado del grupo Australiano <sup>95,96</sup>.

#### 1.5.1.5.5 Estudio del infiltrado inflamatorio en las metástasis de melanoma:

Estudiar el infiltrado inflamatorio en los ganglios linfáticos tiene el problema añadido de que en esta localización existe un tejido linfático estromal pre-existente.

En las metástasis ganglionares Azimi F y cols. mostraron que el infiltrado inflamatorio en los nidos metastásicos del melanoma del ganglio (excluyendo el infiltrado inflamatorio del estroma) era un factor pronóstico independiente <sup>76</sup>.

En estudios más recientes, como parte del proyecto de atlas del genoma del cáncer se han analizado los infiltrados inflamatorios de metástasis del melanoma mediante análisis de expresión de genes <sup>47</sup>. En este caso se ha utilizado un sistema de evaluación del infiltrado inflamatorio que necesita ser validado en una cohorte independiente.

De acuerdo con estos estudios, se ha visto que la transferencia de TIL autólogo en combinación con IL-2 era capaz de producir una regresión tumoral en los pacientes con melanoma metastásico <sup>97</sup>.

#### 1.5.1.5.6 Estudio del infiltrado inflamatorio en el estroma del melanoma:

Se considera estroma tumoral al que está localizado entre los nidos de las células tumorales del melanoma y se piensa que tiene relaciones importantes con las células tumorales.

Hay estudios a favor de que determinadas características del infiltrado estromal tienen relación con el pronóstico, por ejemplo los de Ladanyi y cols que realizaron varios estudios en una pequeña serie en la que estudiaban los linfocitos peritumorales y los intratumorales de forma separada, y encontraron que un número más elevado de linfocitos Th activados, de células B y células dendríticas se asociaban a una mayor supervivencia <sup>98,99, 100</sup>.

Otros autores en cambio no han encontrado relación con la supervivencia y la densidad de linfocitos peritumorales <sup>91</sup>.

En estos trabajos se señala que una investigación acerca del potencial pronóstico de este infiltrado inflamatorio sería de interés.

#### 1.5.1.5.7 Estudio del infiltrado inflamatorio como predictor de respuesta a nuevos tratamientos inmunoterápicos:

El estudio de Tumei y cols. publicado en Nature muestra que la densidad de linfocitos T CD8+ en el margen invasor del melanoma predice la respuesta a pembrolizumab (anti PD1) mejor que la densidad de linfocitos CD4+, PD1+, PDL1+. Estos autores definen el margen invasor como la zona fuera de los nidos tumorales delimitados por la expresión IHQ de la proteína S 100 <sup>101</sup>.

Por este motivo se considera interesante el realizar investigaciones y estudios en el infiltrado peritumoral que puedan predecir la respuesta a estos nuevos tratamientos.

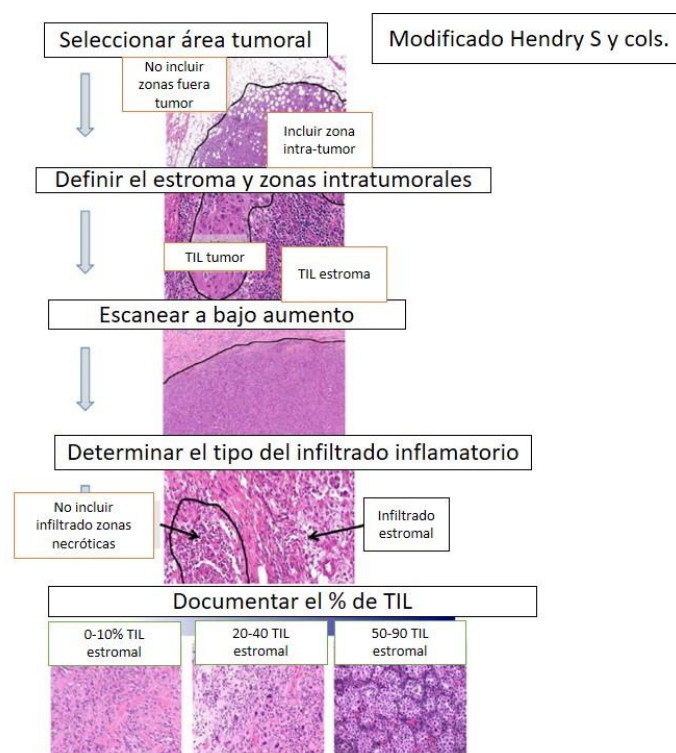


A la hora de realizar estudios de investigación es importante que todos utilicemos la misma terminología. Actualmente se prefiere la definición de "margen invasivo" utilizado por Galeon y cols <sup>102</sup>, que lo definen como el borde que separa el tejido del paciente de las células tumorales con una extensión de 1 mm (dentro de 1 mm se considera tumor y por fuera del mm se considera peri-tumoral).

#### 1.5.1.5.8 Abordaje del TIL en melanoma:

Hendry S y cols <sup>78</sup> proponen el abordaje del TIL en el melanoma que se muestra en la figura 2:

Figura 2: Abordaje TIL en melanoma, modificado de Hendry S y cols <sup>78</sup>.



#### 1.5.1.5.9 Correlación del TIL con la supervivencia:

El estudio con mayor número de pacientes es el realizado por Sarah A.Weiss y cols <sup>103</sup> que en una cohorte de 1241 melanomas primarios, valoran el infiltrado inflamatorio asociado al tumor (ausente, no intenso e intenso) y lo relacionan con la supervivencia de los pacientes. Para el infiltrado inflamatorio utilizaron los marcadores CD3, CD45 y FOXP3.

De los 1241 melanomas, en 388 (31%) el infiltrado se catalogó como ausente, en 330 (27%) como no intenso y en 523 (42%) como intenso y observaron que los pacientes con tumores con TIL intenso tenían una mejoría del tiempo libre de enfermedad y de la supervivencia global de forma estadísticamente significativa en comparación con los pacientes con tumores con TIL

no intenso o ausente, estos últimos entre ellos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

También del estudio de 594 genes inmunoreguladores en 67 melanomas primarios concluyeron que los melanomas con infiltrado inflamatorio ausente o no intenso tenían una expresión similar de genes inmunoreguladores, mientras que, en los catalogados como infiltrados inflamatorios enérgicos se demostró una regulación al alza de la activación de las células T y una inhibición de los reguladores “*checkpoint*”. Por lo tanto concluyen, que los melanomas con un infiltrado inflamatorio intenso tienen un mejor pronóstico que los TIL ausente o no intenso.

#### 1.5.1.6 Subtipo histológico:

Aunque en general el subtipo histológico tiene poco valor pronóstico se ha descrito una mejor evolución del léntigo maligno melanoma y un peor pronóstico de los melanomas lentiginosos acrales.

#### 1.5.1.7 Invasión vascular y angiogénesis

La angiogénesis juega un papel fundamental en el desarrollo de las metástasis del melanoma y la progresión del mismo. En los últimos años numerosos estudios han investigado la importancia clínica y como factor pronóstico de este fenómeno y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha llevado a un mejor conocimiento de la angiogénesis en el melanoma.

Entendemos la angiogénesis como un proceso mediante el cual se pueden formar vasos nuevos para alcanzar nuevos tejidos. Este proceso sucede de forma fisiológica durante la embriogénesis o en procesos regenerativos como la curación de heridas. También se produce pero de forma patológica en procesos neoplásicos <sup>104</sup>.

Este proceso es esencial para el crecimiento tumoral. La angiogénesis en el melanoma fue descrita por primera vez por Warren en 1966 y tiene un papel importante sobre todo en la fase de crecimiento vertical del melanoma (cuando éste se hace invasor). En esta fase se manifiesta como una rica red vascular en el microambiente del tumor <sup>105</sup>.

En esta línea numerosos estudios han mostrado una correlación entre la expresión de ligandos angiogénicos y sus receptores y la progresión tumoral. La angiogénesis se determina midiendo la densidad de vasos intratumorales <sup>106</sup>.

En 1971 Folkman y cols <sup>107</sup> sugirieron la posibilidad de tratamientos antiangiogénicos en el cáncer, y desde entonces la investigación en este campo ha crecido muchísimo. El hecho de que la interacción entre los distintos componentes de la angiogénesis sea un acto dinámico, hace que el bloqueo selectivo sea complicado y ayuda a explicar que haya pacientes en los cuales se ha realizado terapia dirigida pero continúan con la progresión de su proceso.

El mecanismo fundamental es que la rápida proliferación celular incrementa las necesidades de oxígeno y nutrientes y lleva a una hipoxia local, el sistema inmunológico del organismo percibe el microambiente con hipoxia del tumor como un “daño tisular” y ello lleva al organismo a producir una serie de factores proinflamatorios como factores de crecimiento y citoquinas entre otros. Además se genera una matriz tumoral en la que las metaloproteinasas (MMPs) juegan un papel muy importante <sup>108,109</sup>.

#### 1.5.1.7.1 Factores implicados en la angiogénesis:

##### a) Factores de crecimiento:

##### \*Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF):

El VEGF es un polipéptido que actúa al unirse a su receptor tirosin kinasa de las células endoteliales. Se han caracterizado distintas isoformas del VEGF siendo la VEGF165 y la VEGF 121 las predominantes en el melanoma <sup>110</sup>.

##### \*Factor de crecimiento fibroblástico (FGF):

El FGF también se ha implicado en el melanoma y niveles altos del mismo se encuentran en la matriz extracelular, la membrana basal y los vasos neoformados. El FGF interacciona con las MMPs y esto induce proliferación endotelial <sup>111</sup>.

##### \*Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF):

Distintos estudios han demostrado que, en comparación con la piel normal en los melanomas primarios y metastásicos hay un incremento del PDGF. Asimismo, tanto el receptor alfa como el beta de este factor de crecimiento se encuentran elevados en los melanomas. Estudios preclínicos han mostrado que en líneas celulares de melanoma con alto potencial de metastatizar la expresión de PDGFRA es mayor que la de PDGFRB sugiriendo un importante papel en el desarrollo de las metástasis <sup>112</sup>.

##### \*Factores de crecimiento transformante alpha y beta (TGF alpha y TGF B):

En el trabajo de Liu et al se constata que el TGF es capaz de incrementar los niveles de IL 8 en células de melanoma y de promover la angiogénesis en modelos de ratón <sup>113</sup>.

b) Otros biomarcadores:

-Interleuquina 8 (IL-8):

La IL8 estimula la angiogénesis al incrementar la permeabilidad celular. Esta interleuquina interactúa con las fibras de actina y produce una retracción celular que crea unos canales entre las células endoteliales que incrementan la permeabilidad a la sangre e incrementan el potencial metastásico del melanoma. Las lesiones melanocíticas benignas no tienen niveles elevados de IL 8 mientras que los melanomas primarios y los metastásicos secretan niveles altos de la misma de manera constitutiva <sup>114</sup>.

-Integrinas:

Las integrinas incrementan la expresión de MMPs que degradan la matriz extracelular para generar productos como el colágeno o la fibronectina. Estos productos sirven como ligandos de integrinas que potencian los efectos de angiogénesis e invasividad <sup>115</sup>.

La osteopontina es uno de los ligandos más importantes para la integrina  $\alpha 5 \beta 3$  y hay estudios que han demostrado una correlación entre la expresión de osteopontina y la agresividad y un fenotipo invasor en el melanoma cutáneo <sup>116</sup>.

-Uroquinasa activadora del plasminógeno (uPA):

Las células del melanoma expresan una única cadena de la uPA. Este ligando habilita a las células del tumor para interactuar con los receptores de los mismos en las células endoteliales y media la migración celular. Además uPA promueve la degradación de la matriz y facilita la invasión del tumor y su progresión <sup>117</sup>.

- Angiopoietina:

El eje de la angiopoietina es crucial para la embriogénesis, el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Hay 2 proteínas fundamentales de esta familia: la angiopoietina 1 y la 2, que interactúan con sus receptores tirosin kinasa (Tie 1: agonista y Tie 2: antagonista). Hay trabajos que han demostrado que en el melanoma metastásico hay una inversión de los niveles angiopoietina 1/angiopoietina 2 que favorece la formación de vasos inmaduros y la agresividad del tumor <sup>112</sup>.

-Metaloproteasas de la matriz (MMPs):

Las tres metaloproteinasas más estudiadas en el melanoma son la MMP-1, la MMP-2 y la MMP-9. Estudios in vitro han mostrado que la MMP-1 promueve la degradación del colágeno tipo I y IV así como la fragmentación de la matriz <sup>118</sup>.

Otros estudios sugieren que la MMP-9 tiene un doble papel en la iniciación del melanoma y para promover la invasión por el mismo <sup>119</sup>.

#### 1.5.1.7.2 Aspectos histopatológicos de la angiogénesis en el melanoma:

Se sabe que el melanoma tiene una fase de crecimiento horizontal (fase de crecimiento radial) hasta que empieza a invadir en profundidad (fase de crecimiento vertical). La fase de crecimiento vertical requiere una alta actividad angiogénica y es un paso fundamental en el desarrollo del melanoma metastásico. En el trabajo de Kashani- Sabet M y cols utilizando análisis multivariante se demuestra que la vascularización del tumor, incluso más que el grosor del mismo fue el predictor más importante de supervivencia <sup>106</sup>.

La estructura y distribución de la red vascular asociada al tumor difiere de la encontrada de forma fisiológica en tejidos normales y la que se encuentra asociada al tumor contiene áreas con hipervascularización y áreas con hipovascularización. Esta heterogeneidad es debida en parte al crecimiento celular incontrolado que excede la demanda vascular en determinadas áreas tumorales y lleva a la hipoxia focal (que es el estímulo inicial de la angiogénesis).

La red tumoral intravascular presenta una alta variabilidad en el tamaño de los vasos, una baja densidad de pericitos y ausencias focales de la membrana basal <sup>120</sup>.

#### 1.5.1.7.3 Inmunohistoquímica de la angiogénesis en el melanoma:

Identificar la red vascular asociada al melanoma puede ser complicado con las técnicas de H-E. Por ello se han implementado numerosas técnicas IHQ para detectarla. Hay que señalar que la importancia pronóstico de la red vascular del melanoma es controvertida.

Los marcadores de vasos linfáticos son podoplanina/D2-40, LYVE-1 y Prox-1. La podoplanina es una glicoproteína transmembrana que se expresa en el endotelio de los linfáticos. D2-40 es un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce la podoplanina y destaca los vasos linfáticos. LYVE-1 es otro marcador IHQ de linfáticos que se une al hialurónico de la superficie de los mismos.

Prox-1 es un factor de transcripción que regula la expresión de podoplanina en los vasos linfáticos. Prox -1 tiñe el núcleo y permite identificar incluso los vasos linfáticos más pequeños que son difíciles de identificar con H-E <sup>121</sup>.

Los marcadores de vasos sanguíneos incluyen CD31, CD34, Fli1 y factor VIII (factor de Von Willebrand).

CD31 es una glicoproteína transmembrana que se expresa en células endoteliales, CD34 es otra glicoproteína transmembrana que se expresa en células endoteliales, dendrocitos dérmicos, células del sarcoma de Kaposi y glándulas sudoríparas <sup>122</sup>.

Fli 1 es un factor de transcripción nuclear que actúa como marcador de diferenciación endotelial y proliferación celular. Aunque Fli 1 se utiliza sobre todo en neoplasias vasculares como el angiosarcoma también es de utilidad para resaltar la red vascular en el melanoma <sup>123</sup>.

El factor de Von Willebrand es una glicoproteína que interviene en la agregación plaquetaria y promoviendo la activación de la cascada de la coagulación que ocurre en la reparación de heridas. La expresión de este factor en las células endoteliales es variable y diversos estudios han demostrada que la expresión es heterogénea. No se expresa en capilares ni en vasos de pequeño tamaño <sup>124</sup>.

Independientemente de la combinación de estos marcadores inmunohistoquímicos, su uso incrementa la precisión de la detección de la invasión linfovascular en el melanoma. Si se compara con la H-E/IHQ con un sólo marcador vascular/IHQ con marcador melanocítico y marcador vascular (x ej. S100+D2-40, MITF+D2-40, SOX-10+D2-40) este último doble marcaje ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad para la detección de la invasión linfovascular en el melanoma <sup>125</sup>.

#### 1.5.1.7.4 Implicaciones clínicas y pronósticas de los distintos biomarcadores:

Distintos estudios han demostrado una fuerte relación entre la angiogénesis, el VEGF, el diámetro de los vasos, el grosor del melanoma (> 2mm) y la progresión del melanoma <sup>126</sup>.

Es interesante señalar que la densidad microvascular (MVD) y linfovascular (LVD) parecen estar relacionadas entre ellas.

Se han utilizado numerosos métodos para determinar MVD y la LVD. Uno de los más utilizados es el método de Chalkley y se observa que utilizando este método la MVD es un predictor de recurrencia del melanoma <sup>127</sup>.

Tanto la MVD como la LVD se correlacionan con el Breslow, la ulceración y el índice mitótico. Además la afectación linfovascular se asocia con un riesgo de afectación ganglionar <sup>128</sup>.

En un meta-análisis de 2014 con 26 estudios en los que se incluían 1685 melanomas <sup>129</sup> se observó que la LVD peritumoral/ periférica y la invasión linfática, pero no la afectación de la microvasculatura (MVD) o la afectación linfovascular intra-tumoral o central, eran factores pronósticos importantes en los pacientes con melanoma. Estos resultados sugieren que la MVD y la LVD central son factores pronósticos menos importantes que lo que señalaban estudios anteriores y sí tendría mayor importancia pronóstica la LVD peritumoral/periférica o la invasión linfática.

El valor pronóstico del VEGF es controvertido. Algunos estudios muestran que los niveles de VEGF y de IL8 son factores independientes de la progresión del melanoma <sup>130</sup> mientras que otros no avalan este resultado y señalan que la determinación de VEGF mediante IHQ no es un marcador de recurrencia o de metástasis en el melanoma <sup>131</sup>.

Los niveles de IL-8 también se han estudiado y se ha visto que la expresión de IL 8 se correlaciona con un estadio avanzado del melanoma y con una supervivencia pobre. Además, los niveles séricos predicen la respuesta a la inmunoterapia en los pacientes con melanoma metastásico y los pacientes que responden tienen unos niveles de IL 8 significativamente inferiores que los que no responden. Estos resultados sugieren que los niveles séricos de IL 8 se podrían usar como biomarcadores en el seguimiento de los pacientes <sup>132</sup>.

Los niveles de angiopoietina también se han estudiado como biomarcador en el melanoma y se ha visto que los niveles tanto de ang-1 como de ang-2 se encuentran elevados en los pacientes con melanoma en los distintos estadios, pero que los niveles de ang-2 son más altos en los pacientes con estadios avanzados y se correlacionan con una disminución de la supervivencia <sup>133</sup>.

#### 1.5.1.8 Tasa de crecimiento del melanoma:

Otro factor importante a tener en cuenta en el pronóstico del melanoma, la tasa de crecimiento, de hecho la tasa de crecimiento se considera un factor pronóstico independiente en melanoma cutáneo localmente avanzado <sup>134,135</sup>.

### **1.5.2 Factores clínicos:**

#### 1.5.2.1 Sexo:

El sexo es un factor pronóstico importante en los pacientes con melanoma, hay diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la incidencia, características del tumor primario y supervivencia.

La incidencia en función del sexo varía de continente a continente, en los EEUU y en Australia los hombres tienen una mayor incidencia de melanoma, mientras que en Europa el melanoma es más frecuente en las mujeres. Independientemente de las diferencias de incidencia en función de los países, la supervivencia de las mujeres con melanoma es mayor que la de los hombres <sup>136</sup>.

Las mujeres con melanomas con más frecuencia tienen melanomas finos, no ulcerados, localizados en las extremidades y con una edad media de diagnóstico inferior a la de los hombres <sup>137</sup>.

Sin embargo, estas diferencias en las características de los melanomas primarios no explican del todo las diferencias de supervivencia encontradas entre sexos. Muchos estudios que utilizan análisis multivariante encuentran que el sexo por sí mismo es un factor independiente predictor de la supervivencia <sup>57</sup>.

En el estudio de Mervic y cols <sup>57</sup> en 2005 analizan 7338 pacientes con melanoma del sureste de Alemania y encuentran que los hombres tienen una supervivencia a los 10 años del 83,9% en comparación con las mujeres en las que es del 89,5%. Con análisis multivariante y ajustado por otros factores: grosor del tumor (índice de Breslow, presencia de ulceración, nivel de Clark, localización del melanoma, subtipo histopatológico y edad del paciente al diagnóstico) encuentran que el sexo es un factor independiente de supervivencia. Además, la ventaja en cuanto a supervivencia de las mujeres desaparece después de los 60 años <sup>57</sup>. Estos resultados se han encontrado también en otros artículos posteriores <sup>138,139</sup>.



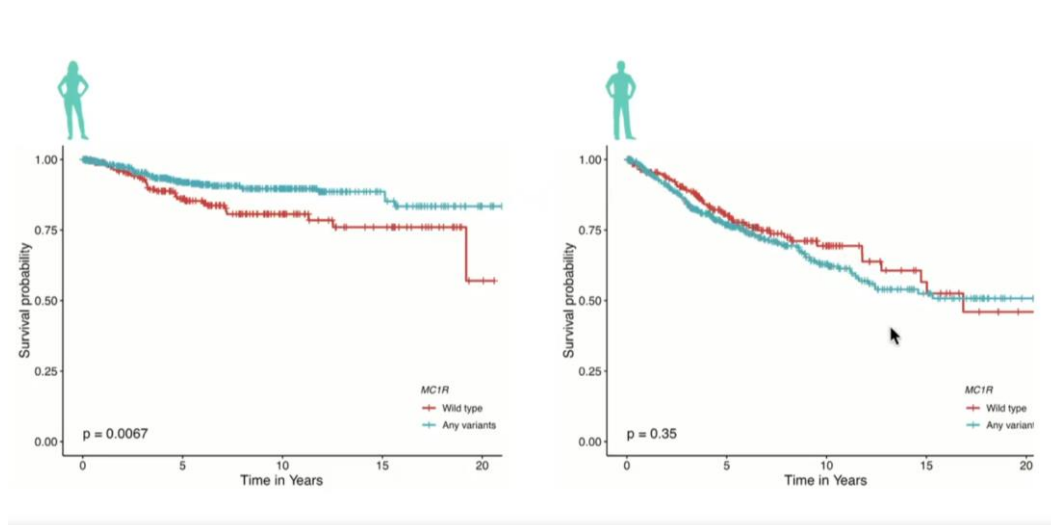
Hasta el momento, los mecanismos moleculares que explicarían estas diferencias de supervivencia son desconocidos; factores hormonales, diferencias en la inmunidad y diferencias en el estrés oxidativo podrían jugar un papel relevante <sup>140</sup>.

Hay estudios también sobre las diferencias genéticas entre hombres y mujeres. Se han estudiado polimorfismos en el gen MC1R (gen del receptor de la melanocortina) entre hombres y mujeres, este gen tiene un papel en el riesgo de desarrollar melanoma pero también tiene un papel en el pronóstico de los pacientes. Se trata de un gen que en su forma *wild type* (sin mutaciones) se encarga de transformar los precursores de los pigmentos en eumelanina, pero hay variantes deficientes, con pacientes que en vez de tener eumelanina tienen feomelanina, y tienen mayor estrés oxidativo que no es capaz de regenerar. Estos pacientes tienen más riesgo de melanoma.

Pero curiosamente el pronóstico de estos pacientes es mejor y aunque tienen más riesgo de desarrollar un melanoma tienen una mayor supervivencia <sup>141</sup>. Así en este artículo publicado en 2012 por Davies JR y cols, se veía que en distintas cohortes de Europa, los pacientes con variantes genéticas de este gen tenían mejor supervivencia que los que no las tenían.

En un estudio de 2019 <sup>142</sup> con 1341 pacientes de la unidad de melanoma del hospital Clinic de Barcelona se concluyó que las variantes del gen MC1R se asociaban a una mejor supervivencia del melanoma en las mujeres pero no en los hombres y se señalaba que se debería incluir el estudio de las variantes de este gen en función del sexo en la práctica clínica habitual. El sexo en la actualidad no se recoge en las guías de la AJCC.

Figura 3: Supervivencia en función de las mutaciones MC1R tomada de Lira Fe y cols <sup>142</sup>.



#### 1.5.2.2 Edad:

La edad de los pacientes también se considera un factor pronóstico en los pacientes con melanoma localmente avanzado <sup>143</sup>.

Algunos autores señalan que en el paciente mayor se asocian otros factores de mal pronóstico: mayor incidencia de melanoma grueso, mayor tasa de ulceración, índices mitóticos más altos y localización en cabeza y cuello.

Además, en los pacientes de mayor edad se ha visto que hay una menor frecuencia de afectación del ganglio centinela a pesar de fenotipos más agresivos. Esto ha sido corroborado en varias series y la atrofia de los vasos linfáticos cutáneos podría contribuir a una disminución de la respuesta inmunitaria. La función linfática evaluada por el tránsito y captación de radiocoloides dentro del ganglio centinela disminuye con la edad. Todo esto condiciona un predominio de la diseminación hematológica en la edad avanzada.

Estos datos condicionan un aumento de la mortalidad por melanoma y una disminución de la tasa de afectación del ganglio centinela por lo que hay que individualizar las decisiones terapéuticas en este grupo de pacientes.

#### 1.5.2.3 Localización del primario:

La localización del melanoma es un factor pronóstico independiente. Los melanomas del tronco, cabeza y cuello tienen peor pronóstico que los localizados en las extremidades.

Los primeros (denominados axiales) tienen con más frecuencia diseminación a distancia en comparación con los localizados en las extremidades. Por otro lado, los melanomas en las extremidades dan metástasis cutáneas con mayor frecuencia que los axiales <sup>144</sup>.

Los melanomas primarios localizados en sitios de pronóstico desfavorable se han clasificado antiguamente como BANS (*back, upper arm, neck, scalp*) o TANS (*trunk, upper arm, neck, scalp*) <sup>145</sup>.

Las diferencias en el curso clínico podrían explicarse por las diferencias en el drenaje linfático de estas localizaciones. La mayor longitud de los vasos linfáticos en las extremidades, así como el mayor número de ganglios linfáticos en su trayecto hasta la circulación sanguínea, podrían ser factores que expliquen el mejor pronóstico de los melanomas localizados en las extremidades <sup>144</sup>.

### **1.5.3 Factores genéticos/ moleculares/ inmunológicos. Biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de lesiones melanocíticas.**

#### 1.5.3.1 Factores genéticos.

El melanoma es uno de los tumores en que se encuentra un mayor número de mutaciones genéticas. Esta alta frecuencia y variabilidad de mutaciones puede ser debido a la presencia de un mutágeno como la radiación ultravioleta o algún otro mutágeno desconocido.

##### **a) Mutación BRAF en melanoma:**

Como se ha comentado en 1.4 la mutación somática en el oncogén BRAF está presente en hasta el 50-70% de los melanomas, siendo con diferencia la mutación más frecuente en el melanoma cutáneo respecto a otras como NRAS, p16 o p53.

La proteína BRAF pertenece a la vía de las MAPK. Se codifica en el gen BRAF, en el cromosoma 7q34<sup>146</sup>. Se han descrito varias mutaciones en el melanoma. La más frecuente (85-90% de los casos) es la mutación en un nucleótido en el codón 600 (V600E) en el exón 15 causante de la sustitución de valina por ácido glutámico (GTG>GAG)<sup>147</sup>.

La segunda mutación más frecuente (V600K) es la que da lugar a la sustitución de valina por lisina (GTG>AAG) con hasta un 20-21% de los casos mutados<sup>148</sup>.

Otras mutaciones en este gen menos frecuentes son V600R (GTG>AGG), V600D (GTG>GAT), V600E2 (GTG>GAA), V600A, V600G, K601N, K601E, L597R, L597Q, G596R y D594N<sup>149</sup>.

La alteración en la proteína BRAF produce una activación constitutiva de la vía de las MAPK, evitando así la necesidad de activación por parte de RAS. Su mutación genera una actividad quinasa de la proteína 10 veces superior a la forma no mutada (BRAF<sup>WT</sup>), conduciendo a la proliferación neoplásica mediada por una transcripción continuada. Varios estudios señalan que los pacientes con melanomas con mutaciones en BRAF tienen un mejor pronóstico; así, Hept y cols<sup>150</sup> en su serie encuentran que los pacientes con mutaciones en BRAF presentan una mayor supervivencia en comparación con los pacientes con mutaciones en NRAS, la localización más frecuente de los mismos es en el tronco, se asocian a una menor edad al diagnóstico e histológicamente presentan una menor tasa mitótica que los NRAS mutados.

Tas F y Erturk K (2019) en su trabajo de Neoplasma<sup>151</sup> estudian la repercusión de las mutaciones en BRAF V600E y su correlación clínico-patológica en pacientes turcos con melanoma estadios I-III; incluyen 93 pacientes adultos y encuentran mutaciones en BRAF

V600E en un 46,2% (43/93) pacientes . Ellos no encuentran una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia en los pacientes con melanomas en estadios I y II pero sí con una mayor supervivencia en pacientes en estadio III.

La relevancia clínica de encontrar mutaciones en BRAF se encuentra en la posibilidad de su respuesta terapéutica a los inhibidores de BRAF y/o de MEK. La evidencia actual señala que las distintas mutaciones de BRAF V600 tienen una capacidad similar de respuesta a estos tratamientos, aunque parece que la respuesta es menor en aquellos pacientes con V600K mutado que con V600 E mutado. Estos tratamientos han demostrado una eficacia superior a la quimioterapia y la combinación de ambos proporciona un aumento del tiempo libre de enfermedad de 12 meses con unas tasas de respuesta del 70% <sup>152</sup>.

Recientemente la combinación de dabrafenib (inhibidor de BRAF) y trametinib (inhibidor de MEK) ha demostrado un incremento del tiempo libre de enfermedad y de la supervivencia global en comparación con la administración individual de cada uno y una menor incidencia de efectos secundarios <sup>153</sup>.

Varios estudios han demostrado la correlación entre diversas alteraciones genómicas y las resistencias intrínsecas o extrínsecas a los inhibidores de BRAF. Entre las causas de resistencia extrínseca se incluyen mutaciones en NRAS, vía y PI3/AKT y amplificaciones o “*splicing* alternativo” en BRAF <sup>154</sup> y entre las causas de resistencia intrínseca se describen mutaciones en PTEN y MAP2k1 <sup>155</sup>.

Idealmente y probablemente en un futuro, en el campo de la medicina personalizada, será posible realizar estudios genéticos previos a un tratamiento que nos informen si el paciente responderá o no de forma satisfactoria en función de su genómica previa y de las características genéticas del tumor.

#### b) Mutación NRAS en melanoma:

La familia de RAS incluye 3 proto-oncogenes: NRAS, KRAS y HRAS que regulan la proliferación celular y la apoptosis. Las mutaciones constitutivas de NRAS activan la vía de MAPK, PI3K y otras vías de señalización celular que causan crecimiento celular, proliferación y disfunción del ciclo celular.

Las mutaciones de NRAS ocurren en más del 20% de los melanomas cutáneos, con mayor frecuencia en el codón 61 y menos frecuentemente en los codones 12 y 13 <sup>156</sup>. Los melanomas

con mutaciones de NRAS se asocian a un curso clínico más agresivo y peor pronóstico y son más frecuentes en zonas de exposición solar intermitente.

Heppt y cols (2017) <sup>150</sup> encuentran en su serie que en los melanomas con mutaciones de NRAS el subtipo histológico más frecuente es el melanoma nodular, así como una mayor frecuencia de metástasis ganglionares y viscerales. Su análisis multivariante muestra que presentar esta mutación es un factor de riesgo independiente para la progresión tumoral y para una menor supervivencia en comparación con los BRAF mutados sobre todo en estadios iniciales de los pacientes con un alto riesgo de melanoma (población de alto riesgo).

Las mutaciones en NRAS también se han asociado con un mayor índice de Breslow así como con una tasa de crecimiento más rápida del tumor primario, aunque hay otros autores que no han encontrado esta asociación <sup>157,158</sup>.

El tratamiento de los melanomas con mutaciones en NRAS muchas veces resulta en un fracaso; se han descrito respuestas moderadas con inhibidores de MEK como el binimetinib <sup>159</sup>, pero el éxito es limitado por lo que es necesario continuar investigando en este campo.

#### c) Mutación c-KIT en melanoma:

Aparte de las mutaciones descritas en BRAF y NRAS, otro gen en el que se encuentran mutaciones de forma frecuente y que tiene implicaciones terapéuticas por la existencia de tratamientos dianas dirigidos frente al mismo, son las mutaciones en c-KIT. Las mutaciones en c-KIT tienen implicaciones pronósticas, ya que estos pacientes pueden responder a mesilato-imatinib (inhibidor c-KIT), aunque los resultados no han sido muy satisfactorios.

KIT es un proto-oncogen tipo receptor tirosín quinasa que se encuentra en la membrana celular y se une a un factor de células madre. La activación de KIT activa múltiples vías de señalización celular que afectan al crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la migración.

Las mutaciones en KIT ocurren en 1-3% de los melanomas y se localizan más frecuentemente en el exón 11 (L576P) o el 13 (K642E) <sup>160</sup>.

En 2006 Curtin JA y cols. analizaron 102 melanomas primarios y vieron mutaciones de KIT en el 39% de los melanomas mucosos, en el 36% de los melanomas acrales, el 28% de los melanomas localizados en la piel con daño solar crónico y en el 0% de los melanomas localizados en la piel sin daño actínico <sup>161</sup>.

Guo y cols en 2011 en un grupo de 43 pacientes con melanoma metastásico con mutaciones de KIT y tratamiento con imatinib, describen el control del melanoma en el 53,5% (respuesta parcial en 10 pacientes y estabilización del mismo en 13) <sup>162</sup>.

En 2011 en una publicación en la revista *Lancet*, Romano y cols. señalaban que las mutaciones en los exones 11 y 13 en KIT predicen mejor la respuesta al tratamiento con imatinib que las amplificaciones en este gen <sup>163</sup>. Diversos estudios han aclarado que la mera expresión inmunohistoquímica de KIT no se correlaciona con la respuesta a imatinib.

En 2018 Gonghz y cols publicaron un meta-análisis sobre el significado clínico de las mutaciones de KIT en melanoma <sup>164</sup>. El objetivo era evaluar la asociación de las mutaciones de KIT con las características clínico-patológicas de los melanomas mediante meta-análisis para identificar diferencias entre las poblaciones asiáticas y raza blanca. Seleccionaron 32 estudios de la literatura con 5224 pacientes, en los que se encontraron mutaciones de KIT en 497 (9,5%) y se encontró una asociación significativa con edad avanzada (OR=1.296, 95% CI: 1.025-1.641; P=0.031), con melanoma de mucosas (OR=1.363, 95% CI: 1.094-1.697; P=0.006) y con melanoma acral (OR=1.374, 95% CI: 1.123-1.682; P=0.02), pero no se encontró asociación con ninguna característica histológica o estadio tumoral. Aunque la tasa de mutaciones de KIT es superior en la raza asiática que en la blanca, no se encontraron diferencias clínicas cuando se analizaron ambos grupos.

#### d) Mutaciones en el gen de la neurofibromatosis tipo I (NF-1):

El producto del gen de la NF-1 es una GTPasa que inactiva la vía MAPK produciendo una regulación a la baja de la actividad de RAS. Las mutaciones o las pérdidas de NF-1 llevan una activación de la vía MAPK.

Las mutaciones en NF-1 están presentes en un 14% de los melanomas, incluyendo hasta un 70% de los melanomas que no tienen mutaciones en BRAF / NRAS <sup>47</sup>.

La mayoría de las mutaciones de NF-1 llevan a una pérdida de función con un 80% de los pacientes teniendo una mutación “nonsense”, una inserción o una delección que da lugar a una proteína no funcional <sup>165</sup>.

Hay datos pre-clínicos que sugieren que la pérdida de NF 1 puede dar lugar a una sensibilidad mayor a los inhibidores de MEK; sin embargo no hay estudios clínicos significativos que avalen este dato <sup>166</sup>.

e) Otros subtipos genómicos:

-Mutaciones/deleciones en CDKN2A:

Las mutaciones en CDKN2A ocurren en un 30% de los tumores con otro 30% de CDKN2 de deleciones. Las mutaciones en p16 /CDK4/ciclinaD1 están implicadas en la melanogénesis. Las mutaciones en CDKN2A que producen una pérdida de función de p16 se ven con frecuencia en los melanomas familiares <sup>167</sup>. En estudios de asociación amplia del genoma (GWAS) se ha mostrado que esta vía puede ser importante no sólo en los melanomas familiares sino también que alteraciones/ amplificaciones en otros *locis*: se han identificado en CDKN2A y CCDND1, CDK4 se ven con más frecuencia en los melanomas *triple wild type*.

Se ha hipotetizado con que las mutaciones en esta vía pueden contribuir a la sensibilidad a los inhibidores de CDK4/6 pero esto no se ha demostrado de forma concluyente en la práctica clínica <sup>168</sup>.

-Mutaciones en p53:

La proteína p53 se encuentra mutada en un 15% de los melanomas y parece que se produce en una fase tardía del desarrollo tumoral. Las mutaciones en p53 se encontraron con frecuencia en los melanomas que albergaban alguno de los subgrupos de melanomas con mutaciones en BRAF/NRAS o NF1.

-Mutaciones en PTEN:

Las mutaciones en PTEN ocurren en mucha menor frecuencia que otras mutaciones en el melanoma y por lo tanto es más difícil la interpretación clínica. Las mutaciones en PTEN o las deleciones que ocurren en T o CC>TT confirieron peor pronóstico según Hayward NK y cols de 2017 <sup>169</sup>.

-Mutaciones en GNAQ/GNA11:

Las mutaciones en estas proteínas G ocurren en aproximadamente el 90% de los melanomas uveales y ocasionalmente en otros melanomas no uveales (pero muy raramente fuera de las lesiones melanocíticas) <sup>170</sup>. Estas mutaciones activadoras desencadenan señalización vía MAPK y PI3K/AKT. La importancia de la señalización vía MAPK ha llevado a la realización de estudios con inhibidores de MEK en el melanoma uveal aunque los resultados son contradictorios <sup>171</sup>.

Sin embargo, sí hay otras alteraciones genéticas que se correlacionan con el pronóstico del melanoma uveal como las mutaciones SFB1 (buen pronóstico), pérdida de BAP 1 (mal pronóstico), monosomía cr 3 (mal pronóstico) y disomía del cr 3 (buen pronóstico) <sup>170</sup>.

-Otras mutaciones:

Las amplificaciones de MYC ocurren en un 8% de los melanomas y se asocian a peor pronóstico y a melanomas amelanóticos <sup>172</sup>. Estudios in vitro han sugerido que las amplificaciones de MYC llevan a una disminución de la función de los linfocitos T <sup>173</sup>.

Mutaciones en la vía WNT/ CTNNB1 se producen en aproximadamente un 10% de los melanomas, aunque las implicaciones clínicas de éstas no están bien establecidas <sup>174</sup>.

Finalmente, también se han encontrado con baja frecuencia mutaciones en ARID2, PPP6C, MAP2K1, IDH1, RB1 entre otras, pero las implicaciones clínicas y en el pronóstico de estas aún no están claros.

Tabla 2: Mutaciones genéticas frecuentes en los melanomas e implicaciones clínicas y pronósticas. Modificada de Davis EJ y cols <sup>159</sup>.

<u>Mutación</u>	<u>Porcentaje (%)</u>	<u>Implicaciones</u>
BRAFV600	40-50	Exposición solar intermitente. Susceptibilidad a inhibidores de BRAF y de MEK
NRAS	10-20	Peor pronóstico, pueden tener mayor respuesta a inmunoterapia.
NF1	10-15	En áreas de exposición solar, pueden tener mejor respuesta a inmunoterapia
KIT	1-3	Melanomas en mucosas y acral, posibilidad de respuesta a inhibidores de KIT
BRAF atípico	4-5	Confieren susceptibilidad a inhibidores de BRAF y MEK
GNAQ/GNA11	80-90(uveales)	
Promotor TERT	40-50	Peor pronóstico. Mutaciones mediadas por UV
CDKN2A	25-35	Deleciones más frecuentes que mutaciones
PTEN	4-8	Pueden correlacionarse con resistencia inmunológica



### 1.5.3.2 Factores inmunológicos:

Se conoce desde hace muchos años la relación entre el melanoma y el sistema inmunológico; de hecho, el melanoma es uno de los tumores malignos más inmunogénicos: las interacciones entre el sistema inmunológico y las células del melanoma son complejas. Las células neoplásicas son capaces de desarrollar mecanismos que impiden el reconocimiento y destrucción por el sistema inmunológico del paciente.

Para la activación del linfocito T son necesarias 2 señales. El receptor de la célula T (TCR) reconoce el antígeno presentado por las células dendríticas a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por otro lado, el *cluster of differentiation* 28 (CD28) de la célula T, mediante la unión a sus ligandos B7-1 o B7-2, produce una señal coactivadora. En ausencia de esta segunda señal, la célula T no responderá ante el estímulo desencadenante y se producirá anergia.

Estas células activadas deben migrar hasta la región del tumor y producir una respuesta de destrucción tumoral. Sin embargo, es frecuente que estos linfocitos intratumorales tengan una capacidad de proliferación y producción de citocinas y citólisis disminuidas, aunque fuera del microambiente tumoral estas células demuestran una respuesta específica potente. Todo ello sugiere que existen ciertas señales al nivel del microambiente tumoral que inhiben la función linfocitaria.

Tras la activación de los linfocitos T, estos expresan CTLA-4. Este receptor se expresa entre 24 y 48 horas después de la activación, y se une a B7 con una mayor afinidad que CD28, causando una señal supresora en las células T. Es un potente coinhibidor implicado en el desarrollo de tolerancia desde etapas tempranas<sup>175</sup>.

La otra molécula que tiene gran importancia inmunológica es la molécula de muerte celular programada 1 (PD1) y su ligando (PD-L1).

PD-1 es un receptor transmembrana de la familia CD28 que normalmente se expresa en linfocitos CD4+ y CD8+ activados. Tiene una función inmunosupresora, que en condiciones normales evita una respuesta inmune excesiva frente a células propias. La expresión de PD-1 es inducida por la activación de los linfocitos T, y deja de expresarse cuando la respuesta inmune ha eliminado el antígeno. Sin embargo, si la respuesta no es eficaz, la expresión de PD-1 se mantiene y genera un fenotipo de linfocitos T ineficaces<sup>176</sup>.

PD-1 tiene 2 ligandos: PD-L1 (B7-H1 o CD274) y PD-L2 (B7-DC o CD273), siendo el primero el que se expresa en un mayor número de células. Cuando PD-L1 se expresa en la superficie de las células tumorales y se une a PD-1 de las células T, se activa una cascada de señalización que inactiva la respuesta del TCR, y por tanto impide la secreción de factores de crecimiento y señales de supervivencia. Por lo tanto la unión del PD-1 de los linfocitos a su ligando desempeña un papel fundamental al bloquear la respuesta inmune.

Estas dos moléculas CTLA4 y PD1 y PD1 ligando son la base del actual tratamiento con inmunoterapia del melanoma que discutiremos más adelante

#### **1.5.4 Revisión de estudios genéticos que comparan los melanomas primarios y sus metástasis.**

En melanoma son pocos los estudios que analizan la correlación mutacional entre la lesión primaria y sus metástasis. Los resultados son heterogéneos, encontrando algunos autores una elevada concordancia mientras que otros muestran tasas de alrededor del 50% <sup>177</sup>.

##### 1.5.4.1 Comparación concordancia mutacional entre tumor primario y sus metástasis en BRAF Y NRAS:

El estudio de la concordancia mutacional entre el tumor primario y sus metástasis es muy importante en el campo de la oncología y recientemente también cobra importancia en dermatología en el campo del melanoma.

Los trabajos con mayor número de pacientes son el de Colombino M <sup>178</sup> y cols y el de Riveiro-Falkenback E. y cols <sup>179</sup>: ambos encontraron una tasa baja de discordancia.

Colombino y cols estudian 102 melanomas primarios y 165 metastásicos, y encuentran una tasa de discordancia de 15/165, siendo las lesiones discordantes un 53% tumores primarios BRAF<sup>WT</sup> con metástasis BRAF<sup>M</sup> y un 47% tumores primarios BRAF<sup>M</sup> con metástasis BRAF<sup>WT</sup> <sup>178</sup>.

Riveiro y cols <sup>179</sup> incluyen 140 melanomas primarios y 171 metástasis emparejadas, obtienen una tasa mayor de concordancia. Dicha tasa es del 83,6% cuando se determina la mutación con la plataforma Cobas® y asciende hasta el 100% de concordancia cuando se combinan la RT-qPCR con la secuenciación y la inmunohistoquímica VE1.

Sin embargo, en estudios con menor número de pacientes la tasa de discordancia es mayor. Yancovitz M y cols <sup>180</sup> estudian la concordancia de BRAF en 18 tumores y sus correspondientes

metástasis. De los 8 casos discordantes, 6 son tumores BRAF<sup>WT</sup> con metástasis BRAF<sup>M</sup>, mientras que 2 son tumores BRAF<sup>M</sup> con metástasis BRAF<sup>WT</sup>. Además, objetivan en 9 de los tumores primarios la presencia de heterogeneidad en el estado mutacional de las poblaciones celulares dentro del mismo tumor.

Una explicación posible de esta discordancia para estos autores podría ser que en el melanoma existen subclones de distintas poblaciones dentro del mismo tumor (heterogeneidad intratumoral). La presencia de estas distintas poblaciones celulares, unas portadoras de la mutación y otras no, permitiría el desarrollo tanto de metástasis BRAF<sup>M</sup> como BRAF<sup>WT</sup>. Del mismo modo, la presencia de heterogeneidad intratumoral (subclones distintos en un mismo tumor) e intertumoral (entre lesiones primarias y sus metástasis) podría explicar la resistencia a las terapias dirigidas y la progresión tras una buena respuesta inicial.

En cualquier caso, aunque dicho porcentaje discordante sea bajo, no debe despreciarse teniendo en cuenta que todos los casos discordantes pueden tratarse de pacientes candidatos a beneficiarse del tratamiento con inhibidores de BRAF (BRAFi) y la no detección de la mutación supondría negarles dicha opción terapéutica.

Parece por tanto lógico proponer que el tejido idóneo para el análisis de la mutación sea el tejido metastásico disponible más reciente, siempre que se disponga de una cantidad adecuada. Cuando no se disponga de acceso a dicho tejido metastásico, la elevada concordancia de los estudios con mayor tamaño muestral nos indica que sería correcto el estudio del tumor primario en su lugar. Del mismo modo, ante una progresión durante tratamiento con inhibidores de BRAF, deberían analizarse las nuevas metástasis valorando la posible progresión por parte de clones no portadores de la mutación. La utilización de técnicas combinadas, como la RT-qPCR y la inmunohistoquímica, permitiría además aumentar la sensibilidad en la detección de la mutación.

#### 1.5.4.2 Comparación de la concordancia mutacional entre tumor primario y sus metástasis en CKIT:

No hemos encontrado en la literatura muchos estudios en los que se compare la concordancia mutacional en c- KIT entre el melanoma primario y sus metástasis. En el artículo publicado por Dai B y cols <sup>181</sup> se analizan las mutaciones en c-KIT en 39 casos de melanoma acral primario y en sus metástasis correspondientes (17 metástasis linfáticas, 6 recurrencias locales y 3 metástasis cutáneas) y encontraron mutaciones en c-KIT en 17 casos de los 39 melanomas

acrales primarios (43,6%) .La expresión de KIT en pacientes sin metástasis linfáticas en su presentación era más alta de forma estadísticamente significativa ( $p=0,024$ ). Los autores concluyen que las mutaciones en Kit son frecuentes en los melanomas acrales y los pacientes deben ser estudiados para detectar mutaciones de los mismos y que el estado mutacional de los mismos puede cambiar en las metástasis o las recurrencias de los mismos. Este hallazgo tiene importancia clínica y terapéutica y los mecanismos que lo producen requieren más investigación.

En el artículo publicado en 2018 de Lee SH y cols <sup>182</sup> estudian la correlación mutacional en 43 pacientes entre el primario y sus metástasis (tanto de BRAF, NRAS, c KIT y GNAQ/GNA11). Encontraron amplificación de c-KIT en un 28,6% de sus pacientes (aunque hay que tener en cuenta que se trata de población asiática en la cual la incidencia de melanoma acral es mayor).

De los 43 pacientes en los cuales estudian el primario y las metástasis encuentran un 55,8 (n=24) de discordancia entre el estadio mutacional del primario y sus metástasis.

En el caso de c-KIT encuentran mutaciones en los mismos en 31 pacientes (en el primario), encontrando concordancia mutacional (se encontraba la misma alteración genética en el primario y en las metástasis) en 19/31 pacientes y discordancia en 12/31 pacientes <sup>182</sup>.

#### 1.5.4.3 Comparación de la concordancia mutacional entre tumor primario y sus metástasis en GNAQ/GNA11 en melanoma uveal:

El melanoma ocular es una forma poco frecuente de melanoma. Dentro de éste el más frecuente es el melanoma desarrollado en la membrana uveal. El estudio con mayor número de pacientes es del de Van Raamsdonk CD y cols de 2010 <sup>183</sup> en el que encuentran mutaciones somáticas en GNAQ/GNA11 en un 83% de los melanomas uveales, y señalan que la activación constitutiva asociada a estos 2 genes parece jugar un papel importante en la patogenia del mismo.

En otros estudios publicados parece que la concordancia mutacional entre el primario y las metástasis es alta en este tipo de tumores. Así en el estudio de Lee SH y cols (2018)

<sup>182</sup>encuentran una concordancia mutacional del 100% (en los 6 pacientes que estudiaron).

## 1.6 Estadificación del melanoma:

Los esquemas de estadiaje del cáncer permiten identificar a aquellos pacientes que tienen riesgo elevado de sufrir una enfermedad avanzada, ofrecer información del pronóstico al paciente y a sus familiares y recomendar los mejores tratamientos.

En el melanoma se utiliza el sistema TNM para describir la extensión de la enfermedad. En este sistema se evalúan 3 factores: la extensión del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M).

En 1999, la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) creó un comité para revisar los sistemas utilizados hasta entonces y un nuevo sistema de estadificación del melanoma que se hizo oficial con la publicación de la sexta edición del Manual de Estadiaje del Cáncer AJCC de 2002. La edición más reciente ha sido publicada en 2018 <sup>60</sup>.

Tabla 3: Clasificación TNM del melanoma 2018

### Categoría T

Clasificación	Espesor en mm	Ulceración
T1	</= 1 mm	a: <0,8mm sin ulceración b: <0,8mm con ulceración o 0,8-1mm con o sin ulceración
T2	1,01-2mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T3	2,01-4mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T4	>4mm	a: sin ulceración b: con ulceración

### Categoría N (afectación ganglionar)

Nx	Afectación ganglionar no puede determinarse (extirpación previa por otro motivo, hábito corporal...)
N0	Ausencia de afectación ganglionar clínica/radiológica
N1	N1a: micrometástasis en 1 ganglio linfático(clínicamente oculto) N1b: ganglio linfático clínicamente detectado N1c: metástasis en tránsito, satélites o microsátélites sin afectación ganglionar

<b>N2</b>	<p><b>N2a:</b> micrometástasis en 2 o 3 ganglios (clínicamente ocultos)</p> <p><b>N2b:</b> metástasis en 2 o 3 ganglios linfáticos</p> <p><b>N2c:</b> metástasis en 1 ganglio (oculto o clínico) y metástasis en tránsito, satélites o microsatélites.</p>
<b>N3</b>	<p><b>N3a:</b> 4 o más micrometástasis en ganglios linfáticos</p> <p><b>N3b:</b> 4 o más metástasis en ganglios linfáticos, al menos una de ella clínicamente evidente o presencia de <b>conglomerado adenopático</b></p> <p><b>N3c:</b> 2 o más micrometástasis o metástasis ganglionares clínicamente detectables o presencia de conglomerado adenopático y <b>metástasis en tránsito, satélites o microsatélites</b></p>

#### Categoría M (metástasis)

<b>M0</b>	Sin evidencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	<p><b>M1a:</b> metástasis a distancia en <b>piel, tejidos blandos</b> (incluyendo músculo) <b>y/o ganglios linfáticos no regionales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M1a(0): LDH normal</li> <li>- M1a(1): LDH elevada</li> </ul> <p><b>M1b:</b> metástasis <b>pulmonares</b> con/sin M1a</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M1b(0): LDH normal</li> <li>- M1b(1): LDH elevada</li> </ul> <p><b>M1c:</b> metástasis a distancia en <b>órganos distintos del SNC</b> con/sin M1a y M1b</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M1c(0): LDH normal</li> <li>- M1c(1): LDH elevada</li> </ul> <p><b>M1d:</b> metástasis al <b>SNC</b> con/sin M1a, M1b o M1c</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M1d(0): LDH normal</li> <li>- M1d(1): LDH elevada</li> </ul>

#### Definición de los grupos de estadiaje de la AJCC del melanoma cutáneo 8ª edición <sup>60</sup>

Tis	N0	M0	Estadio 0
T1a-T1b	N0	M0	Estadio IA
T2a	N0	M0	Estadio IB
T2b-T3a	N0	M0	Estadio IIA
T3b-T4a	N0	M0	Estadio IIB
T4b	N0	M0	Estadio IIC
T0	N1b/1c	M0	Estadio IIIB
T0	N2b/2c, N3b/3c	M0	Estadio IIIC
T1a/b-T2a	N1a, N2a	M0	Estadio IIIA
T1a/b-T2a	N1b/1c, N2b	M0	Estadio IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	Estadio IIIB
T1a/T3a	N2c/N3a,b,c	M0	Estadio IIIC
T3b/T4a	N1-N3	M0	Estadio IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	Estadio IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	Estadio IIID
Cualquier T	Cualquier N	M1	Estadio IV

## **1.7 Diagnóstico histológico del melanoma:**

El estudio histopatológico continúa siendo la prueba fundamental para el diagnóstico del melanoma, la mayoría de los mismos pueden diagnosticarse mediante estudio convencional con hematoxilina –eosina (H-E) y con técnicas de inmunohistoquímica. A pesar de ello, existen ciertas lesiones en las cuales incluso dermatopatólogos expertos pueden no estar de acuerdo. En estos casos son necesarias las nuevas técnicas de diagnóstico.

### **1.7.1 Diagnóstico mediante H-E.**

A lo largo de los años se ha señalado que los melanomas evolucionan en 2 fases: una primera fase de crecimiento radial, en la cual los melanocitos neoplásicos se extienden por la epidermis y se produce la infiltración de la dermis papilar por células aisladas o pequeños nidos de células. En esta fase teóricamente no existe riesgo de diseminación a distancia; y una segunda fase de crecimiento vertical que se caracteriza por la presencia de nidos o nódulos de melanocitos tumorales en la dermis, existiendo la capacidad de producir metástasis <sup>184</sup>.

Existe una serie de criterios histológicos para el diagnóstico del melanoma que incluyen <sup>185</sup>:  
(Adaptado de Ackerman A, Cerroni L, <sup>185</sup>)

-Patrón arquitectural:

- Asimetría.
- Escasa circunscripción del componente melanocítico intraepidérmico.
- La silueta de la base tumoral es irregular (excepto en el melanoma nevoide).
- Falta de maduración de los melanocíticos en profundidad.
- Los nidos de melanocitos en la epidermis no son equidistantes entre sí.
- Nidos de melanocitos de tamaños y formas variables.
- Algunos nidos de melanocitos confluyen.
- Dispersión de melanocitos por encima de la unión dermoepidérmica.
- Predominio de melanocitos solitarios sobre los nidos en la epidermis.
- Los melanocitos de algunos nidos no están cohesionados.
- Los melanocitos se extienden hacia el epitelio anexial.
- Láminas de melanocitos en la dermis.
- A veces los nidos de la base de las lesiones son de gran tamaño.

- Morfología celular:

-Melanocitos atípicos.

-Figuras de mitosis generalmente escasas.

-Melanocitos necróticos.

-Otras características

-Signos de regresión.

-Elastosis actínica.

-“Polvo “de melanina en las células tumorales.

-La melanina no se distribuye de forma uniforme.

-Células plasmáticas en la base de la lesión.

### **1.7.2 Inmunohistoquímica en el melanoma:**

El diagnóstico del melanoma cutáneo se basa fundamentalmente en el estudio con H-E, pero en casos dudosos (por ejemplo lesiones muy pequeñas) o tumores metastásicos de origen desconocido, puede ser de utilidad la realización de técnicas de inmunohistoquímica, aunque hay que destacar que no hay ningún patrón de inmuno-tinción que por sí mismo permita diferenciar al 100% lesiones benignas de lesiones malignas. La IHQ también es de gran utilidad para valorar la arquitectura de las lesiones (simétrica/asimétrica), valorar márgenes de las lesiones, valorar el tamaño de las lesiones y diferenciar lesiones regresadas entre otras cosas.

La inmunohistoquímica puede ayudar a diferenciar el melanoma de otras lesiones que histológicamente se parecen, ya que el melanoma es el “gran simulador”, aunque como muy bien dice el Dr Roustan: ¿Quién no lo es?

Existen numerosos antígenos asociados al melanoma para los que existen tinciones inmunohistoquímicas, siendo los más utilizados los que se describen a continuación <sup>186, 187, 188,189.</sup>

-HMB45: el nombre es un acrónimo de” *Human Melanoma Black*”, reconoce la proteína específica de los melanosomas PMEL17/gp100. Tiene gran especificidad por los melanocitos y células névicas, pero utilidad limitada por su escasa sensibilidad. El patrón de tinción es citoplasmático.



También puede ser positivo en células no melanocíticas que contengan melanosomas fagocitados como en el caso de los melanófagos, o transferidos a queratinocitos desde melanocitos dendríticos vecinos como en queratosis actínicas pigmentadas <sup>188</sup>.

-Tirosinasa: se trata de una enzima que participa en la síntesis de la melanina. Presenta una alta sensibilidad, aunque en el melanoma se reduce con la progresión tumoral y con el desarrollo de metástasis <sup>187</sup>.

-MART1 (EE.UU)/MELAN A (Europa): El Melan A es un componente de la membrana del premelanosoma, producto del gen MART <sup>189</sup>. Es de los marcadores más utilizados y la tinción es citoplasmática. Puede expresarse también en histiocitos (aunque la tinción es menor y el núcleo es distinto) y en ocasiones puede perderse en algunos melanomas, fundamentalmente los melanomas desmoplásicos <sup>186</sup>. Hay que tener cuidado con este marcador al estudiar proliferaciones melanocíticas intraepidérmicas en áreas de piel con importante daño actínico crónico, porque la tinción con Melan-A se extiende a los queratinocitos vecinos, y puede confundirse con una queratosis actínica hiperpigmentada o con piel con daño actínico crónico <sup>190</sup>.

-MIFT (factor de transcripción de la microftalmía 1): Es una proteína nuclear implicada en el desarrollo embriológico de los melanocitos y la regulación de la síntesis de melanina. Se trata de un factor de transcripción que se limita a los melanocitos, muy útil para diferenciar el léntigo solar del léntigo maligno. Se trata de un marcador nuclear, lo que facilita su interpretación y se ha encontrado positividad de MIFT 1 hasta en el 88% de las metástasis de melanoma <sup>191</sup>.

-SOX 10: Es un factor de transcripción, útil para el diagnóstico de melanoma desmoplásico. Tinción nuclear (útil en muestras artefactadas), lo que facilita su interpretación en comparación con MELAN A, S100 o HMB45. También se expresa en otros tumores como los tumores anexiales cutáneos o tumores de vainas nerviosas.

Ha demostrado ser muy útil para distinguir entre la proliferación de melanocitos dendríticos que a veces se observa en las cicatrices de extirpación de melanomas desmoplásicos y la verdadera persistencia de un melanoma desmoplásico, ya que la tinción con SOX-10 marca de manera más específica los restos de melanoma y no los melanocitos dendríticos de la cicatriz, como sucede con la tinción con la proteína S-100 <sup>192</sup>.

-P16: Se trata de una proteína supresora involucrada en senescencia celular, se pierde en lesiones malignas.

-S100: Es el primer marcador que se utilizó para el diagnóstico del melanoma en 1965 Se denomina “S” porque se trata de una proteína soluble de unión al calcio en una solución saturada en sulfato de amonio al 100%. Se trata de una tinción citoplasmática y nuclear.

Es el marcador más sensible para la detección de melanocitos ya que se expresa en el 100% de las células de los nevus melanocíticos y en el 98% de las células de los melanomas, pero es poco específico ya que también presentan esta tinción las células de Langerhans, las células dendríticas, glándulas ecrinas, células de Schwann, los condrocitos y el tejido adiposo.

El S100 puede perderse en algunos melanomas como por ejemplo en los subungueales y en el léntigo maligno. Es un marcador que siempre hay que utilizar en combinación con otras tinciones IHQ, generalmente se utiliza en el “cóctel de melanoma”, con el objetivo de aumentar la sensibilidad. En España con frecuencia se utiliza HMB 45/ MELAN A/ Tirosinasa, pero hay que tener en cuenta que siempre debe utilizarse conjuntamente con otros marcadores IHQ como S100.

-Ki67/Mib-1: es el marcador más utilizado para valorar la proliferación celular y es muy útil para diferenciar lesiones benignas de lesiones malignas. La tinción es nuclear y su expresión en lesiones melanocíticas benignas es inferior al 5%, y en general se encuentra en las células de la unión dermoepidérmica mientras que en las lesiones malignas se encuentra un porcentaje superior al 5% en muchas áreas profundas de la lesión<sup>187</sup>.

Tabla 4: Resumen de la inmunohistoquímica de los tumores melanocíticos. Modificada de Prieto y Shea <sup>188</sup>.

<b>Marcador</b>	<b>Patrón de tinción</b>	<b>Utilidad</b>
S100	Nuclear y citoplasmático	Marcador más sensible para melanoma y melanoma de células fusiformes/melanoma desmoplásico
HMB45	Citoplasmático	Mayor especificidad que S-100 para melanoma. Puede ayudar en el diagnóstico diferencial entre melanoma y nevo melanocítico
MELAN A	Citoplasmático	Sensibilidad y especificidad similar a HMB45, tinción más difusa e intensa
Tirosinasa	Citoplasmático	Gran sensibilidad y especificidad para melanoma, sin embargo la sensibilidad decrece al aumentar el estadio del tumor y en las metástasis
Ki -67	Nuclear	Marca menos del 5% de células en nevos melanocíticos, entre el 13-30% en melanoma (importantes porcentajes también en nevo de Spitz)
SOX 10	Nuclear	Más sensible que la S-100 al marcar melanomas S-100 negativos. Útil para diferenciar melanoma desmoplásico de proliferación de melanocitos en cicatrices
MIFT-1	Nuclear	Alta sensibilidad, pero menor especificidad. Muy útil en la identificación de núcleos de melanocitos en neoplasias melanocíticas muy pigmentadas después de blanquearlas

### 1.7.3 Marcadores inmunohistoquímicos utilizados para el estudio del infiltrado inflamatorio

Sólo mencionaremos y de forma resumida los vamos a utilizar en nuestro trabajo y lo desarrollaremos más adelante:

- Marcador de los linfocitos B: anticuerpo anti CD 20.
- Para identificar los linfocitos T anticuerpos monoclonales anti CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 y CD8.
- El CD4 es un marcador de linfocitos T colaboradores (LTh), el CD8 es un marcador de linfocitos T citotóxicos y de algunas células *natural Killer* (NK).
- Granzima, perforina y TIA 1 (*T cell restricted intracellular antigen 1*) son marcadores de linfocitos T citotóxicos y células NK <sup>187</sup>.

### 1.7.4 Marcadores inmunohistoquímicos utilizados para el estudio del endotelio:

-CD31: Es una glicoproteína transmembrana que se expresa en todos los endotelios, tanto continuos como discontinuos. Es el marcador más sensible y específico para establecer la diferenciación endotelial. Es útil en el diagnóstico de las neoplasias vasculares tanto benignas como malignas, y en el resto de tumores para la valoración de la angiogénesis tumoral. También se expresa en macrófagos, por lo que hay que tener cuidado para evitar errores diagnósticos <sup>186</sup>. Por ser el más sensible y específico, es el que se ha decidido utilizar en este trabajo para valorar la angiogénesis tumoral.

-CD 34: Es una sialomucina que se encuentra en células endoteliales, células precursoras del sistema hematopoyético y en fibroblastos dendríticos. Es, por lo tanto, un marcador sensible pero poco específico.

-WT-1 (proteína 1 del tumor de Wilms): Es un anticuerpo monoclonal que identifica un factor de transcripción codificado por un gen localizado en el cromosoma 11p13. Su tinción es nuclear y se expresa en el endotelio proliferante estimulado por angiopoietina 2 de las neoplasias e hiperplasias vasculares. Se utiliza principalmente para diferenciar neoplasias vasculares de malformaciones vasculares (en las cuales no se encuentra tinción+) <sup>193</sup>.

-Podoplanina: Se trata de una sialoglucoproteína de superficie que se expresa en el citoplasma de células linfáticas. Se utiliza fundamentalmente como detector de tejido linfático sano y de malformaciones linfáticas <sup>186</sup>.

-Prox-1: es un factor de transcripción nuclear con un papel fundamental en la embriogénesis linfática. Es un marcador IHQ muy útil para la diferenciación de células endoteliales linfáticas de células endoteliales sanguíneas <sup>186</sup>.

-VEGF 3 (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular): se expresa inicialmente en el endotelio de los vasos sanguíneos embrionarios y posteriormente su expresión se limita a los vasos linfáticos <sup>194</sup>.

-Fli 1: Se trata de una proteína que en tejido sano identifica células endoteliales y linfocitos pequeños, posiblemente células T. Se trata de un marcador nuclear y por lo tanto tiene la ventaja de facilitar los resultados de inmunohistoquímica. No se debe olvidar en la interpretación de los resultados con Fli -1 su expresión en los linfocitos, por lo que hay que tener cuidado de no confundir linfocitos con células tumorales.

#### **1.7.5 Nuevas técnicas de diagnóstico FISH/HGC:**

Desde hace ya varios años se vienen utilizando técnicas moleculares para el diagnóstico de melanoma cuando las técnicas de hematoxilina –eosina o técnicas de inmunohistoquímica no son suficientes para establecer el diagnóstico. Son técnicas caras que no están disponibles en todos los laboratorios.

Estas técnicas tienen una elevada sensibilidad y especificidad y se basan en estudiar las anomalías a nivel del ADN. Las más utilizadas son la hibridación genómica comparada (HGC) y la fluorescencia de hibridación in situ (FISH).

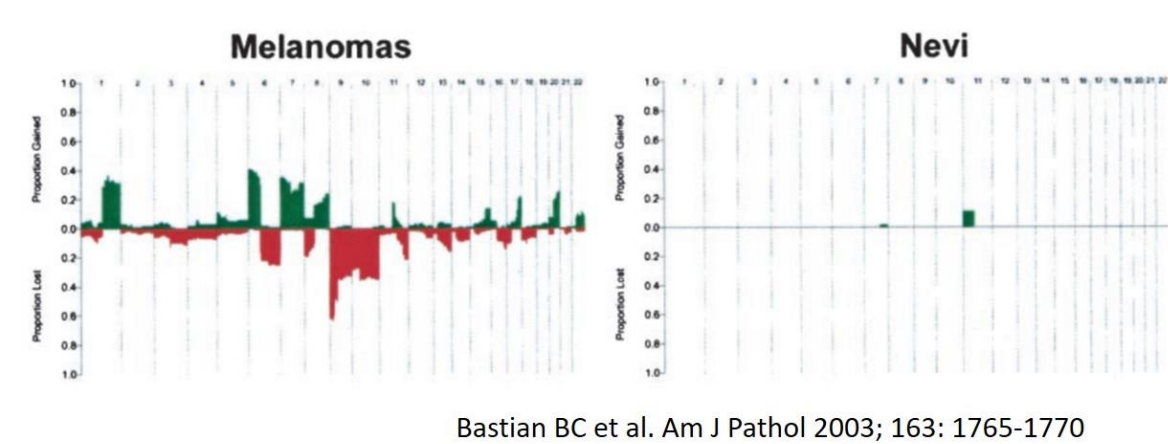
Se ha visto que en los melanomas es frecuente la ganancia /pérdida de material genético, mientras que en los nevus melanocíticos no las presentan o son mucho menores.

Por lo tanto, los nevus y los melanomas se diferencian por la presencia o ausencia de anomalías cromosómicas.

Los melanomas muestran patrones recurrentes de aberraciones cromosómicas: ganancias de 1q, 6p, 7, 8q, 17q y 20q y pérdidas de 6q, 8p, 9p y 10q.

Los nevus no suelen presentar alteraciones genómicas, salvo un 20% aproximadamente de los nevus de Spitz con incrementos aislados del cr 11p.

Figura 4: Alteraciones genómicas detectadas mediante HGC en melanomas y nevi. Tomada de Bastian BC y cols <sup>7</sup>.



Bastian BC et al. Am J Pathol 2003; 163: 1765-1770

En la siguiente tabla se resumen las anomalías más frecuentemente encontradas en los nevi melanocíticos y en los melanomas.

Tabla 5: Resumen de anomalías más frecuentes .Modificada de Bastian BC y cols <sup>7</sup>.

Tipo de lesión	Alteraciones genómicas	Principales variaciones
Nevus melanocítico	Sin alteraciones o escasas	↑11p y ↓3p21
Melanoma	Múltiples aberraciones ( ganancias y/o pérdidas ) de fragmentos cromosómicos	↑ 1q,6p,7, 8q, 17q, 20q  ↓ 6q, 8p, 9p y 10q

#### 1.7.5.1 Hibridación genómica comparada (HGC):

Es la técnica más utilizada en la actualidad y evalúa las alteraciones en el genoma (ADN) basándose en la detección de anomalías en el número de copias del ADN en las células tumorales. Las diferencias entre las células tumorales y normales son las que marcan las ganancias o pérdidas del tumor.

##### Usos de la HGC:

- 1) Permite el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma.
- 2) Permite una clasificación de los melanomas en función de la exposición solar.
- 3) Puede detectar oncogenes y genes supresores de tumores.
- 4) Es útil en el seguimiento de los pacientes con melanoma <sup>195</sup>.

La HGC con respecto al uso de FISH tiene la ventaja de que permite analizar todo el genoma de forma simultánea por lo que aporta más información.

##### Limitaciones de HGC:

- Sólo permite el estudio de loci específicos.
- Difícil análisis de los resultados.
- Interpretación dependiente del investigador.

#### 1.7.5.2 Fluorescencia de hibridación in situ (FISH):

Los hallazgos de las aberraciones cromosómica, publicadas en el artículo de Bastian Bc y cols en 2003 <sup>7</sup>, han permitido el desarrollo de técnicas basadas en FISH aplicables a tejido en parafina.

Utilidades hasta el momento actual:

- 1.- Diferenciar nevus de melanoma <sup>196</sup>.

En el estudio de Bastian y cols seleccionaron las 14 bandas cromosómicas con mayor sensibilidad para ser evaluadas por FISH. Siempre que sea posible las sondas se dirigen a los genes con relevancia en el cáncer.

Las combinaciones de sondas con más utilidad fueron 3 dirigidas al cr 6 en el brazo corto (6p25), centrómero (CEP6) y al brazo largo del cr 6 (6q23) en combinación con una sonda para el cromosoma 11q13.

En este artículo se concluye que esta técnica tiene una sensibilidad del 87,6% y una especificidad del 95,4%.

Se considera un FISH positivo cuando uno de los siguientes criterios se cumple: (1)  $\geq 55\%$  núcleos con ganancias de 6p25 respecto CEP6; (2)  $\geq 40\%$  núcleos con pérdidas de 6q; (3)  $\geq 29\%$  núcleos con ganancias de 6p25; o (4)  $\geq 38\%$  núcleos con ganancias de 11q13.

2.-Distinción de nevus melanocítico en ganglio vs melanoma metastásico <sup>197</sup>:

No todos los melanocitos que se encuentran en un ganglio indican metástasis, incluso cuando estos se encuentran en las vías de drenaje de los mismos. Hay situaciones en las cuales no hay duda para el diagnóstico de metástasis de melanoma, como es cuando se encuentra borramiento de la arquitectura de los ganglios, afectación masiva del parénquima y células con pleomorfismo y mitosis, pero sin embargo, cuando la afectación del ganglio se limita a pequeños grupos de células que no tienen muchas alteraciones citológicas el diagnóstico se convierte en un reto.

Dalton SR y cols señalan la utilidad de la técnica FISH para estas situaciones difíciles, describiendo varios casos en los cuales múltiples aberraciones cromosómicas estaban presentes en los casos positivos, algunas de las cuales se encontraban también en los tumores primarios <sup>197</sup>. Observan una sensibilidad del FISH para diagnóstico de melanomas primarios del 85% y de metástasis de melanoma del 83% (20/24). Apuntan que la interpretación del FISH mejora cuando se estudia conjuntamente con el melanoma primario. No encontraron en su serie ningún caso en el cual las aberraciones cromosómicas estuvieran presentes en el melanoma primario y ninguna en la metástasis ganglionar.

Uno de los principales factores limitantes en el estudio con FISH de los ganglios linfáticos fue la presencia de un material inadecuado en los cortes, ya que de los 115 ganglios en los que se estudiaron los depósitos, sólo se obtuvo material adecuado en 41 de ellos. Concluyen que el uso de FISH puede ser de utilidad en estos casos en los que la histopatología tradicional resulta ambigua.



### 3.- Diagnóstico de neoplasias melanocíticas con melanocitosis pagetoide <sup>198</sup>:

La melanocitosis pagetoide es una característica de los melanomas, pero también puede estar presente en lesiones benignas como los nevus de Spitz, nevus acrales traumatizados o después de la exposición solar.

### 4- FISH en el pronóstico del melanoma <sup>199</sup>:

North JP y cols en su trabajo de 2011 <sup>199</sup> sugieren que las técnicas moleculares pueden ayudar a identificar a los tumores con mayor potencial metastásico, y por lo tanto peor pronóstico.

## **1.8 Opciones terapéuticas en el melanoma:**

### **1.8.1 Tratamiento del melanoma localizado estadios I y II:**

La cirugía es el pilar fundamental del melanoma cutáneo primario y consiste en la extirpación del mismo y posterior ampliación correcta y adecuada de los márgenes.

Esta necesidad de ampliar los márgenes se debe a que el melanoma puede extenderse a mayor distancia o profundidad de lo que es visible clínicamente.

Se han definido unos márgenes en función del espesor tumoral de tal manera que <sup>200</sup>:

- Melanoma *in situ*: margen de 0,5 cm.
- Melanoma infiltrante con Breslow <1 mm: margen de 1 cm.
- Melanoma con Breslow > 1mm: margen de 2 cm.

Si el melanoma se diagnostica en la fase de crecimiento radial y la enfermedad está localizada en la piel, la extirpación puede llevar a la curación clínica, sin embargo si el melanoma ya está en la fase de crecimiento vertical el melanoma ya tiene capacidad metastásica <sup>201</sup>.

### **1.8.2 Tratamiento del melanoma metastásico regional: Estadio III**

La extensión metastásica del melanoma es sobre todo loco-regional, es decir da metástasis en la piel circundante y en los ganglios de drenaje en un 70% de los pacientes. Aproximadamente un 20% de los pacientes con un melanoma cutáneo de >1 mm de índice de Breslow de profundidad, sin datos clínicos ni radiológicos de afectación ganglionar, presentan metástasis ganglionares microscópicas. Por ello se propuso la biopsia selectiva de ganglio centinela (BGC) para identificar a estos pacientes <sup>202</sup>.

La BGC se ha convertido en la forma de estadificar y definir el pronóstico de los melanomas cutáneos primarios de >0,78 mm de Breslow. Hay numerosas publicaciones que señalan el estudio del mismo como un importante factor pronóstico para la supervivencia y la recidiva <sup>203</sup>.

En los pacientes en los cuales se detecta la existencia de metástasis ganglionares mediante la exploración clínica o técnicas de imagen el tratamiento de elección clásicamente ha consistido en la linfadenectomía de la zona afecta <sup>204</sup>, aunque en los últimos años es objeto de discusión al no aumentar claramente la supervivencia global y sólo la supervivencia libre de enfermedad.

### **1.8.3 Tratamiento del melanoma con metástasis a distancia (estadio IV):**

La mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios localizados de la enfermedad en los cuales la cirugía es curativa en la mayoría de ellos, sin embargo aproximadamente un 10% de los melanomas son diagnosticados en estadios avanzados, irresecables o metastásicos.

Es para estos pacientes en estadios avanzados en los cuales se ha producido una auténtica revolución en el tratamiento a partir de 2011 con la llegada de fármacos dirigidos a dianas específicas y la inmunoterapia, en contraposición con la quimioterapia clásica que se utilizaba hasta entonces <sup>205</sup>.

#### 1.8.3.1 Quimioterapia clásica:

La quimioterapia citotóxica nunca ha demostrado una gran actividad en estos pacientes. Los fármacos utilizados son la dacarbacina, temozolomida, carboplatino, cisplatino, vindesina y vimblastina entre otros.

El fármaco más utilizado sigue siendo la dacarbacina que ha demostrado la máxima eficacia (aunque pobre) en monoterapia en la mayoría de los estudios y también ha resultado eficaz al combinarla con IFN alfa o tamoxifeno. Utilizando la dacarbacina como fármaco único se pueden obtener unas respuestas de un 10-15% con una duración media de la respuesta de 5-6 meses <sup>206</sup>.

#### 1.8.3.2 Cirugía:

La resección de las metástasis puede proporcionar un efecto paliativo y, en pacientes escogidos, una mayor supervivencia a largo plazo. Entre los factores que mejoran el pronóstico están la existencia de metástasis no viscerales aisladas y la resección completa con

márgenes libres. En el caso de las metástasis cerebrales, la resección quirúrgica puede prolongar la supervivencia media 10 meses y mejorar la calidad de vida <sup>207</sup>.

#### 1.8.3.3 Radioterapia:

Se puede utilizar en pacientes con lesiones irresecables con unos resultados favorables. No hay estudios que respalden el uso de la radioterapia adyuvante tras la resección de metástasis ganglionares regionales. No mejora la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia global <sup>208</sup>.

La radioterapia cerebral total combinada con la resección quirúrgica es el tratamiento fundamental de las metástasis cerebrales <sup>209</sup>.

#### 1.8.3.4 Tratamiento dirigido:

Se han desarrollado inhibidores de molécula pequeña que actúan selectivamente sobre la BRAF quinasa mutada. La FDA y la EMA han aprobado el uso de vemurafenib, dabrafenib y encorafenib basándose en los ensayos clínicos en fase III en los que se han comparado ambos con dacarbazina. Desgraciadamente los pacientes tratados exclusivamente con inhibidores de BRAF desarrollan resistencia tumoral en aproximadamente 6 meses. Por esto se combinaron los inhibidores de BRAF con los inhibidores de MEK como el trametinib, el cobimetinib y el binimetinib. Estas combinaciones permitieron prolongar a 10 meses el tiempo medio para el desarrollo de resistencias al tratamiento y lo que es más importante, disminuyó la incidencia de efectos adversos. Por lo tanto, en la actualidad se recomienda combinar un inhibidor de BRAF con un inhibidor de MEK en los pacientes que tienen mutaciones activadoras de BRAF <sup>210</sup>.

#### 1.8.3.5 Inmunoterapia:

La inmunoterapia se basa en el concepto de que el sistema inmunitario es capaz de combatir el cáncer, por lo que se podría conseguir un efecto terapéutico mediante la infusión de efectores del sistema inmunitario.

Actualmente los inhibidores de puntos de control inmunitario constituyen un tratamiento de primera línea en pacientes con lesiones en estadio IV y que carecen de una mutación BRAF activadora. Estos anticuerpos antagonizan receptores inhibidores de los linfocitos T estimulando de este modo las respuestas inmunitarias existentes contra antígenos del melanoma <sup>211</sup>. Así tenemos:

-Ipilimumab: aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico en 2011 y por la AEMA. Es un fármaco anti CTLA4 .La mediana de supervivencia es de 9,5 meses, pero de forma llamativa hasta un 22% de los pacientes sobreviven a largo plazo. Es un fármaco con una elevada frecuencia de efectos adversos, la mayor parte de ellos autoinmunes.

-Fármacos anti PD 1:

\*Nivolumab: Aprobado por la agencia española del medicamento en 2015, disponible desde febrero de 2016 para pacientes con melanoma irresecable o metastásico, independientemente de la mutación BRAF. Es un anticuerpo monoclonal que se une con alta afinidad a PD-1 e inhibe la interacción con PD-L1 y PD-L2, aumentando la proliferación y secreción de citoquinas de las células T específicas <sup>212</sup>.

\*Pembrolizumab: Aprobado desde febrero de 2016 por la Agencia Española del medicamento para el tratamiento de melanoma avanzado (irresecable o metastásico). Se trata de un fármaco anti PD1 y el de mayor afinidad por este ligando de los disponibles actualmente.

- Fármacos anti PDL1 ligando:

\*Atezolizumab

-Virus oncolíticos:

\*Talimogene laherparepvec:

Desde finales de 2015 está aprobado por la FDA y la EMA el talimogene laherparepvec para el tratamiento de pacientes con melanoma irresecable y metástasis regionales o a distancia (estadios IIIB, IIIC y IVM1a) sin afectación visceral <sup>213</sup>.

Es un VHS-1 atenuado, producido mediante recombinación génica, diseñado para replicarse de forma específica en el interior de las células tumorales y para producir factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (GM-CSF), y así estimular la respuesta antitumoral sistémica.

La administración del fármaco es subcutánea, y debe realizarse directamente sobre las lesiones cutáneas de melanoma. En caso de ser múltiples, deben tratarse primero las de mayor tamaño.

El tratamiento con talimogene laherparepvec ha demostrado tasas de respuesta del 26%, con un perfil de efectos adversos favorable y aumento de la supervivencia a largo plazo. Además, en comparación con ipilimumab y el vemurafenib, la supervivencia global ha mostrado ser comparable o ligeramente superior, especialmente en los pacientes sin metástasis viscerales.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1 Hipótesis

Como se ha comentado en la introducción, el melanoma es uno de los tumores más agresivos del ser humano con un alto índice de mortalidad debido fundamentalmente a las metástasis producidas por el mismo. Es por tanto fundamental realizar trabajos de investigación sobre los marcadores que nos permitan identificar a los pacientes que van a desarrollar dichas metástasis. Recientemente se ha utilizado el término de “endofenotipo” para nombrar/identificar aquellos marcadores propios de cada individuo que pueden relacionarse en estos casos con el desarrollo de metástasis.

En los últimos años se han adquirido relevancia dos aspectos fundamentales en el desarrollo de las mismas: el sistema inmune y la neovascularización.

El modo de estudiar el sistema inmune es muy variado, siendo una de las formas es mediante el estudio del infiltrado inflamatorio asociado al mismo (TIL). Como hemos señalado anteriormente en 1.5.1.5.8, ya en 2003 se publicó que las células del sistema inmunitario del huésped aparecían como un mecanismo de defensa frente al tumor y que su presencia se relacionaba con un mejor pronóstico.

Por otro lado, la angiogénesis y la linfangiogénesis juegan un papel fundamental en el desarrollo de las metástasis del melanoma y en la progresión del mismo. En esta línea, numerosos estudios han demostrado una correlación entre la expresión de ligandos angiogénicos y linfangiogénicos y sus receptores y la progresión tumoral. La angiogénesis se determina midiendo la densidad de vasos en el TIL (tanto de los vasos endoteliales mediante CD31 como de los vasos linfáticos mediante D2-40).

Con esta base nos planteamos el estudio del infiltrado inflamatorio acompañante del melanoma mediante el análisis de los distintos componentes del mismo utilizando técnicas de inmunohistoquímica (CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD40, GZMB) y el análisis de la neovascularización mediante el estudio de los vasos en el TIL en dos series de pacientes con melanoma metastásico y no metastásico.

Y apoyándonos en la inteligencia artificial en su rama de *Machine Learning* crear árboles de decisión que nos permitieran con los datos de endofenotipo de nuestros pacientes predecir cuáles van a desarrollar metástasis y cuáles no.

Ho Los melanomas primarios metastásicos NO tienen un infiltrado asociado al tumor TIL clasificado como ausente o “no energético” y NO tienen un fenotipo inmunohistoquímico asociado a tolerancia inmunológica.

Los melanomas no metastásicos tienen un infiltrado asociado al tumor (TIL) clasificado como ausente o anérgico y tienen un fenotipo inmunohistoquímico asociado a tolerancia inmunológica

La densidad de vasos asociados al tumor tanto endoteliales como linfáticos es mayor en los melanomas primarios no metastásicos que en los melanomas metastásicos.

Mediante el uso de técnicas de Machine learning o aprendizaje automatizado no podemos predecir qué pacientes van a desarrollar metástasis en función de su endofenotipo

H1 Los melanomas primarios metastásicos tienen un infiltrado asociado al tumor (TIL) clasificado como ausente o “no energético y con un perfil IHQ asociado a tolerancia inmunológica.

Los melanomas primarios no metastásicos tienen un infiltrado asociado al tumor (TIL) clasificado como energético y un perfil de IHQ del mismo NO asociado a tolerancia inmunológica.

La densidad de vasos asociados al tumor (tanto endoteliales como linfáticos) es mayor en los melanomas metastásicos que en los no metastásicos.

Mediante el uso de técnicas de “Machine learning” o aprendizaje automatizado podemos predecir que pacientes van a desarrollar metástasis en función de su endofenotipo.

## **2.2 Objetivos:**

- a) Describir las características clínicas y anatomopatológicas de nuestra serie de pacientes con melanoma metastásico y no metastásico.
- b) Describir las características inmunohistoquímicas del infiltrado inflamatorio acompañante de los melanomas primarios metastásicos y no metastásicos.
- c) Comparar las características inmunohistoquímicas del infiltrado inflamatorio asociado a tumor (TIL) de los melanomas primarios metastásicos con las de los no metastásicos.



- d) Describir la densidad de vasos (endoteliales y linfáticos) asociados al tumor en los melanomas primarios metastásicos y en la de los no metastásicos.
- e) Comparar la densidad de vasos tumorales entre los melanomas primarios metastásicos con la de los no metastásicos.
- f) Creación de árboles de decisión basados en “*Machine learning*” que nos permitan, a partir de características anatomopatológicas y de IHQ, predecir qué pacientes van a desarrollar metástasis y cuáles no.

# **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se plantea un estudio retrospectivo de casos y controles analíticos, con análisis de muestras del servicio de anatomía patológica del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid) entre los años 2000-2020 de melanomas cutáneos primarios metastásicos y de melanomas primarios no metastásicos diagnosticados en este hospital. No se tomaron nuevas muestras de pacientes ni se realizaron procedimientos invasivos.

### **3.1 Muestras a estudio**

Se estudia una muestra de melanomas cutáneos metastásicos y de melanomas cutáneos no metastásicos atendidos en el hospital Puerta de Hierro de Majadahonda, Madrid durante 2000-2020. El protocolo del estudio es aprobado por el Comité Ético del hospital (ver anexo I).

### **3.2 Selección de los casos**

En el estudio se recogen 2 series de melanomas. La primera serie, está constituida por 40 melanomas cutáneos metastásicos (incluyéndose metástasis ganglionares y viscerales), cuyas muestras histológicas se conservan en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se incluyen todos los casos diagnosticados en ese periodo de los cuales se tiene material anatomopatológico tanto del primario como de las metástasis subsecuentes.

- Criterios de inclusión:
  - 1) Diagnóstico histológico de melanoma cutáneo y diagnóstico histológico de metástasis ganglionar o visceral.
  - 2) Disponibilidad de muestra histológica tanto del primario como de las metástasis subsecuentes.
  - 3) Seguimiento clínico y disponibilidad de la información clínico-patológica.
- Criterios de exclusión:
  - 1) Melanoma de localización extra-cutánea. Se excluyeron los melanomas coroides y los melanomas de mucosas.
  - 2) Metástasis de melanomas de las que no se disponía del melanoma primario.
  - 3) Melanomas primarios de los cuales no se disponía de material anatomopatológico de las metástasis.
  - 4) Tamaño del tumor insuficiente para la realización de las técnicas del estudio.

La segunda serie incluye 41 melanomas cutáneos no metastásicos diagnosticados entre enero 2010 y enero 2020, cuyas muestras histológicas se conservan en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se seleccionaron los controles en ese periodo de tiempo de manera aleatoria de manera que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Melanoma cutáneo con diagnóstico histológico de melanoma con índice de Breslow > 1 mm al que se le ha realizado ganglio centinela siendo este negativo y que durante el periodo de seguimiento no ha desarrollado metástasis.
- 2) Melanomas de los que se disponía de la muestra histológica del melanoma primario.
- 3) Seguimiento clínico y disponibilidad de la información clínico-patológica.

Criterios de exclusión:

- 1) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con un índice de Breslow < 1 mm.
- 2) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con índice de Breslow > 1 mm que fueron positivos.
- 3) Melanomas cutáneos a los que se realizó ganglio centinela con índice de Breslow > 1 mm y que desarrollaron progresión metastásica de la enfermedad en el periodo de seguimiento.
- 4) Melanomas cutáneos de los que no se disponía de la muestra histológica (por proceder de otro centro u otras causas).
- 5) Melanomas con regresión histológica completa.
- 6) Melanomas coroideos o de mucosas.

Se recogen variables demográficas, clínicas, anatomopatológicas y de seguimiento de forma retrospectiva y se realizan estudios inmunohistoquímicos en muestras histológicas disponibles en el servicio de anatomía patológica del hospital.

Una vez seleccionados los pacientes, se revisaron las historias clínicas de todos ellos y se recogieron los datos de interés que se detallan más adelante, así como su evolución.

Las 81 muestras se procesaron de manera similar en el servicio de anatomía patológica de este hospital.

Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 4% durante 24 horas, y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina para su procesamiento. Los tejidos fueron cortados en

secciones histológicas con un espesor entre 4 y 5 micras de espesor utilizando un microtomo semiautomático de rotación de la marca Micro<sup>R</sup>.

A continuación, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina con un teñidor automático Leica, modelo Autostainer XL<sup>R</sup>, siguiendo un protocolo estandarizado. Una vez desparafinadas en xilol se hidrataron en series decrecientes de etanol, se tiñeron con hematoxilina durante 2 min, se lavaron en agua corriente y se contra-tiñeron con eosina alcohólica durante 1 min. Finalmente, las secciones se deshidrataron y se montaron de forma definitiva con xilol.

Tras su tinción, las secciones de las lesiones fueron diagnosticadas por 2 dermatopatólogos expertos que fueron los que realizaron el diagnóstico tanto del melanoma como de las metástasis.

### 3.3 Variables clínicas estudiadas

Tabla 6: Variables clínicas estudiadas. Codificación:

Variable clínica	Tipo variable	Codificación
<b>Sexo</b>	cualitativa	Hombre/mujer
<b>Edad</b>	cuantitativa	Años
<b>Fecha de diagnóstico del primario</b>	cuantitativa	Fecha
<b>Localización</b>	cualitativa	BANS Si/No
<b>Realización de ganglio centinela</b>	cualitativa	Si/No
<b>Positivo</b>	cualitativo	Si/No
<b>Fecha de realización del GC</b>	cuantitativa	Fecha
<b>Linfadenectomía</b>	cualitativa	Si/No
<b>Metástasis viscerales</b>	cualitativa	Si/No
<b>Fecha diagnóstico mts viscerales</b>	cuantitativa	Fecha
<b>Localización mts viscerales</b>	cualitativa	Pulmonares =1

		Hepáticas/esplénicas =2 Óseas=3 Parótida =4 >3 localizaciones=5 Cerebrales =6 Mediastínicas =7
<b>Fecha última revisión</b>	cuantitativa	Fecha
<b>Estado de la última revisión</b>	cualitativa	1-Vivo 2-Muerto por melanoma 3-Muerto x otra causa 4-Perdido 5- Muerto causa desconocida
<b>Seguimiento</b>	cuantitativa	Meses

### 3.4 Variables anatomopatológicas estudiadas:

Se han revisado todos los casos y se ha seleccionado un bloque representativo de la lesión.

Se han valorado las siguientes variables anatomopatológicas:

-Tipo melanoma: melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, léntigo maligno melanoma y melanoma lentiginoso acral.

- Espesor de Breslow: medido mediante un ocular micrométrico, en sentido vertical, desde el estrato granuloso de la epidermis hasta la parte más profunda de invasión y expresado en milímetros.

- Presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario tumoral: los linfocitos tienen que romper y rodear las células tumorales de la fase de crecimiento vertical para que se pueda definir la presencia de infiltrado linfocítico. Este infiltrado se ha clasificado en tres categorías (enérgico, no enérgico, ausente) usando los criterios de Clark expuestos en la introducción. En los casos en

que los linfocitos infiltran difusamente todo el componente infiltrante o están presentes e infiltran toda la base del componente infiltrante, el infiltrado se ha catalogado como enérgico. Un infiltrado linfocitario tumoral no enérgico está definido por la presencia de algunos linfocitos infiltrando el melanoma focalmente o no en toda la base del componente infiltrante. Y, por último, los casos donde no se han visto linfocitos se han clasificado como ausencia de infiltrado.

- Presencia o no de invasión tumoral vascular o perineural.

- Existencia o no de nevus asociado.

- Presencia o no de regresión: La regresión se define como la presencia de un área en el seno del melanoma en el que el tumor disminuye o desaparece y es sustituido progresivamente por fibrosis, con cantidades variables de melanófagos, inflamación y neovascularización.

Tabla 7: Variables anatomopatológicas estudiadas. Codificación:

Variable anatomopatológica	Tipo de variable	Codificación
<b>Tipo de melanoma</b>	cualitativa	MES =1  MN=2  LMM=3  MLA=4  Otros=5
<b>Índice de Breslow (mm)</b>	cuantitativa	Milímetros
<b>Infiltrado inflamatorio (TIL)</b>	cualitativa	Til ausente =0  Til no enérgico =1  Til enérgico=2
<b>Regresión</b>	cualitativa	Si/No
<b>Invasión vascular</b>	cualitativa	Si/No
<b>Invasión perineural</b>	cualitativa	Si/No
<b>Nevus previo asociado</b>	cualitativa	Si/No

### 3.5 Variables inmunohistoquímicas estudiadas del infiltrado inflamatorio y de los vasos tumorales:

El estudio IHQ se realizó sobre los TMAS que se obtuvieron de las muestras de cada uno de los pacientes. Se estudiaron los siguientes marcadores:

1.-**CD3** (como “pan-marcador” de células T y co-receptor de linfocitos T<sup>214</sup>): Los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón, clon Polyclonal de DAKO GA503<sup>R</sup>, incluyendo un control positivo.

El patrón de tinción de este marcador es de membrana y se ha valorado en la zona con mayor infiltración inflamatoria, en un campo de gran aumento (x400), el porcentaje de células positivas en relación con el resto de la celularidad inflamatoria presente en ese mismo campo. Se valoró la tinción tisular de CD3 en el TMA de modo semi-cuantitativo de la siguiente forma:

0=0-10% de positividad

+1 = 10-25% de positividad

+2=25-50% de positividad

+3=> 50% de positividad

2.-**CD4 y CD8**: Con estos marcadores linfoides se ha estudiado el tipo de linfocito T predominante en el infiltrado linfocitario intratumoral de todos los casos. El patrón de tinción de estos dos marcadores es de membrana (como CD3) y se ha valorado, en la zona con mayor infiltración inflamatoria, en un campo de gran aumento (x400), el porcentaje de células positivas en relación con el resto de la celularidad inflamatoria presente en ese mismo campo.

Se han valorado de forma semi-cuantitativa siguiendo el mismo esquema que para CD 3.

3.-**Granzima**: Utilizado como marcador de linfocito T CD 8 citotóxico y células NK.

Las granzimas son una familia de proteasas de serina altamente homólogas, contenidas en gránulos citotóxicos provenientes de los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (*natural killer*, NK) de la inmunidad innata y adaptativa.

La tinción en este caso es citoplasmática granular y se han valorado de forma semi-cuantitativa siguiendo el mismo esquema que para CD 3, CD4 y CD8.



4.- **FOXP3**: utilizado como marcador de linfocito T CD 4 colaborador.

El patrón de tinción es nuclear y se ha valorado de forma semi-cuantitativa siguiendo el mismo esquema:

0=0-10% de positividad

+1 = 10-25% de positividad

+2=25-50% de positividad

+3=> 50% de positividad

5.-**CD 20**: Utilizado como marcador de linfocito B. Los linfocitos B tienen como actividad principal la secreción de inmunoglobulinas. Este proceso es consecuencia de la diferenciación a células plasmáticas, y en el mismo intervienen tanto señales provenientes del contacto con el antígeno como la influencia de la actividad auxiliadora de los linfocitos T CD4+.

Se han valorado de forma semi-cuantitativa siguiendo el mismo esquema que para el resto de marcadores:

0=0-10% de positividad

+1 = 10-25% de positividad

+2=25-50% de positividad

+3=> 50% de positividad

6.-**PD1**: PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), también denominada receptor CD279 es una proteína transmembrana tipo 1 perteneciente a la superfamilia CD28 de las inmunoglobulinas que se expresa en gran parte de las células de estirpe hematopoyética: linfocitos B y T, células *natural-killer*, células *T-natural killer*, células dendríticas, mastocitos y macrófagos <sup>216,217</sup>.

Se ha valorado de forma semi-cuantitativa siguiendo el mismo esquema.

0=0-10% de positividad

+1 = 10-25% de positividad

+2=25-50% de positividad

+3=> 50% de positividad

7.-**CD 31** (vascularización): Este marcador inmunohistoquímico es un marcador de estirpe endotelial. Se ha usado para la cuantificación de los vasos peritumorales. La cuantificación de

los vasos peritumorales se realizó contando en 10 campos con gran aumento (x400) todas las estructuras tubulares con expresión de CD31 presentes en la dermis de la base tumoral y, posteriormente se ha realizado la media, para dar una cifra numérica (cuantitativo).

**8.-D2-40 (podoplanina):** Marcador inmunohistoquímico de estirpe linfática. Se ha usado para la cuantificación de los vasos linfáticos peritumorales. La cuantificación de los vasos peritumorales se realizó contando en 10 campos con gran aumento (x400) todas las estructuras tubulares con expresión de CD31 presentes en la dermis de la base tumoral y, posteriormente se ha realizado la media, para dar una cifra numérica (cuantitativo).

Tabla 8: Anticuerpos, clones, casas comerciales, diluciones y protocolos de desenmascaramiento utilizados:

Proteína	Clon	Origen	Dilución/ Tiempo incubación	Desenmascaramiento antigénico
<b>CD3</b>	Polyclonal	DAKO GA503	Ready to use; 20´	PH alto
<b>CD4</b>	4B12	LEICA NCL-L- CD4-368	1:50 20´	PH alto
<b>CD8</b>	C8/144B	DAKO GA623	Ready to use; 20´	PH alto
<b>CD20</b>	L26	DAKO GA604	Ready to use; 20´	PH alto
<b>Granzima</b>	GrB-7	DAKO M7235	1:50 20´	PH bajo
<b>PD1</b>	NAT105	ROCHE 07099029001	ready to use; 40´	CC1
<b>CD 31</b>	JC70A	DAKO GA610	Ready to use; 20´	PH alto
<b>Podoplanina</b>	D2-40	DAKO IR072	Ready to use; 20´	PH alto
<b>FOXP3</b>	Clon 236 A7E7	Invitrogene 14-4777-82	1:25 20´	PH bajo

Tabla 9: Variables inmunohistoquímicas utilizadas:

Variable IHQ	Tipo de variable	Descripción
CD3	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
CD4	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA. +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
CD8	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
CD20	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
FOXP3	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
PD1	Semi-cuantitativa	0=0-10% de positividad: NEGATIVA +1 = 10-25% de positividad: DÉBIL +2=25-50% de positividad: MODERADA +3=> 50% de positividad: INTENSA
CD 31	cuantitativa	Valor numérico
D2-40	cuantitativa	Valor numérico

### 3.6 Construcción de los “Tissue Microarrays” TMA o matrices tisulares:

#### 3.6.1 Concepto de matriz de tejidos:

El concepto básico de la tecnología del *tissue array* es una modificación del bloque multitejido propuesto por Batifora en 1986 <sup>218</sup> y del “*paraffin core method*” descrito por Wan y cols en 1987 <sup>219</sup>.

Esta tecnología aporta mayor precisión ya que en ella se emplean un gran número de fragmentos tisulares en un único bloque de parafina. La primera descripción de la técnica fue realizada por Kononen en 1998 <sup>220</sup> y posteriormente numerosos artículos han validado su utilidad <sup>221</sup>.

La técnica consiste en que, con un equipo que tiene unas agujas de acero inoxidable de pared fina se toman unas biopsias- cilindros de zonas previamente seleccionadas por un patólogo experto que sean representativas de la muestra que se quiere estudiar. Estos cilindros se toman del bloque de parafina original al cual se le llama “bloque donante” y se transfieren a un nuevo bloque de parafina en blanco que se denomina “bloque receptor”.

Un sistema digital de precisión permite colocar los cilindros de los bloques donantes en el bloque receptor, y se obtiene un tamaño uniforme de los mismos que está separado de los adyacentes por una distancia también uniforme previamente determinada.

El “*tissue array*” que obtenemos o matriz tisular resultante permite contener cientos de muestras tisulares.

Este bloque receptor obtenido se corta y procesa de la misma forma que un bloque de parafina habitual. Los cortes de la matriz tisular pueden teñirse con hematoxilina-eosina u otras tinciones y pueden realizarse distintas técnicas moleculares como detección de ADN o ARN, FISH, PCR o IHQ. Gracias a ello pueden realizarse análisis consecutivos de más de 200 marcadores utilizando un único bloque y establecer correlaciones de las características morfológicas, genotípicas y fenotípicas en la entidad a estudiar.

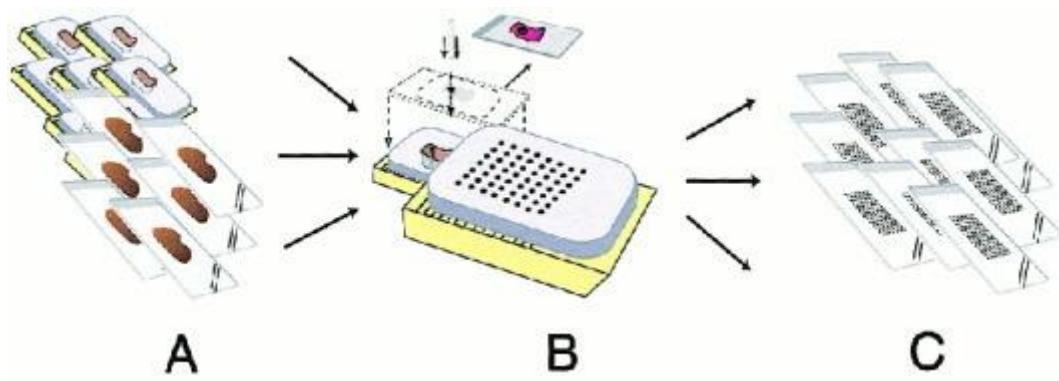
Esta técnica tiene el potencial de acelerar el estudio de muestras biológicas para explorar asociaciones entre cambios moleculares, información clínico-patológica y además nos permite guardar esta valiosa información del proceso de investigación realizado. También tiene la ventaja de que debido a que todas las muestras son tratadas en las mismas condiciones, se consigue un alto grado de homogeneidad con cualquier técnica aplicada.

Figura 5: Construcción de “*tissue microarray*” descrita por Kononen y cols <sup>222</sup>.

A: Se parte del bloque donante del cual patólogos expertos seleccionan áreas representativas.

B: Se pinchan las zonas seleccionadas del bloque donante con unas agujas finas redondeadas de acero y se transfieren de manera coordinada los cilindros de tejido de *array* definitivo a las zonas del bloque receptor.

C: Un sistema con tapa adhesiva facilita el corte del bloque receptor. Cada elemento tisular en el *array* mide 0,6 mm de diámetro y dista 0,1 mm de cada elemento adyacente.



### 3.6.2.- Construcción de los “*tissue microarrays*” o matrices tisulares:

La técnica incluye varios pasos:

a) Elección de las preparaciones histológicas:

De cada uno de los casos y de los controles que se estudiaron se seleccionaron por dos expertas dermatopatólogas, dos áreas representativas de la lesión con un microscopio óptico. Se eligieron las zonas con el máximo número de células posibles e intentando que se visualizara bien la interfase estroma-tumor. Las zonas elegidas se marcaron con un rotulador.

Figura 6: Selección de las zonas más representativas de las presentaciones histológicas



b) Diseño de la plantilla de la matriz tisular:

En una hoja de cálculo de Microsoft Excel<sup>®</sup> se diseñó una plantilla con la distribución final de los pacientes.

c) Selección del bloque donante:

Después de la revisión de historias clínicas y de la selección de los pacientes con melanoma metastásico en el hospital Puerta de Hierro entre los años 2000-2020, se obtuvieron 40 pacientes de los cuales se seleccionaron los bloques correspondientes del archivo del servicio de anatomía patológica de dicho hospital.

Asimismo se seleccionaron los bloques de 41 pacientes con melanoma no metastásico entre 2010-2020.

Figura 7: Selección de los bloques donantes:



d) Reelaboración de los bloques donantes:

Se rehicieron los bloques seleccionados con el mismo tipo de parafina intentando igualar el grosor de 2 mm (que fue el grosor medio utilizado para la construcción de la matriz tisular) de la parafina en todos ellos con el objetivo de homogeneizar la técnica.

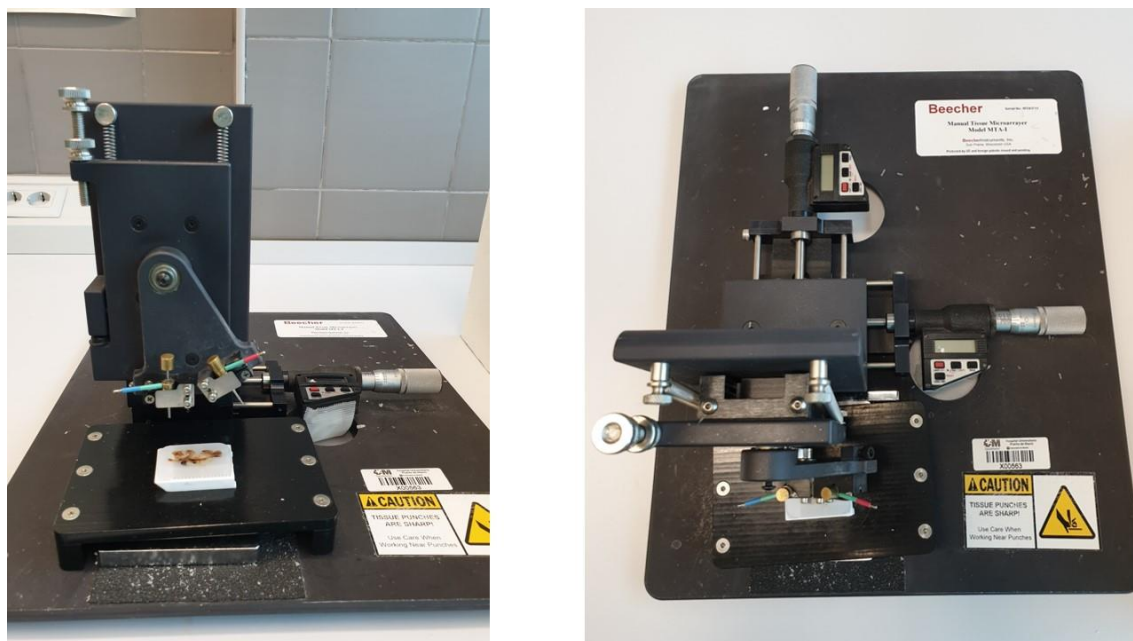
e) Selección en el bloque donante de la zona a pinchar:

Se enfrentaron las preparaciones histológicas seleccionadas con el bloque de parafina correspondiente y se fueron marcando las zonas elegidas en el bloque donante con un rotulador.

f) Realización del bloque receptor:

La fase de realización de las matrices tisulares de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio del servicio de anatomía patológica del hospital Puerta de Hierro de Majadahonda de Madrid. Se utilizó un *arrayer* MTA -1 Beecher<sup>®</sup> dotado con una medición digital micrométrica de agujas de 1,5 mm de diámetro.

Figura 8: Manual *Tissue Microarrayer* modelo MTA-1. Beecher<sup>®</sup>



Se preparó un bloque de parafina habitual “en blanco” para utilizar como receptor de las muestras de tejido obtenidas. Se ajustó el bloque receptor en el portabloques de modo que la superficie del bloque fuera paralela a la placa base y se efectuó el agujero correspondiente en el bloque de parafina receptor con una aguja de calibre más fino y ajustando la profundidad de descenso de las agujas a 3 mm. Después se colocó el bloque donante sobre un puente y se cambió la posición de las agujas. Se pinchó en la zona marcada en el bloque donante con una aguja de 1,5 mm y se expulsó el cilindro de tejido exactamente encima del hueco realizado en la parafina del bloque receptor. El cilindro se empujó con un embolo situado en el interior de la aguja de modo que quedara justo a nivel de la parafina sin hundirla.

De cada bloque donante se tomaron 2 cilindros de las zonas previamente seleccionadas y se fueron colocando en filas y en columnas siguiendo la plantilla previamente diseñada y separada unos de otros por una distancia de 1,5 mm.



Para nuestro estudio se obtuvieron 2 TMAS, con 162 muestras (cada uno de contenía dos cilindros de cada caso de melanoma metastásico y dos cilindros de cada caso de melanoma no metastásico)

Una vez terminado el bloque receptor se mantuvo en una estufa a 37º C durante 15 minutos para facilitar la adhesión de los cilindros de tejido a la parafina en los huecos del bloque receptor.

De los 2 bloques construidos en nuestro estudio uno corresponde a melanomas no metastásicos (con 82 muestras, 2 por cada caso de melanoma no metastásico) y otro corresponde a melanomas metastásicos (con 80 muestras, 2 por cada caso de melanoma metastásico), organizadas según los siguientes esquemas:

TMA1	no mtz							
TMA 2020	MELANOMAS							
B16-6458A2	B16-20784B2	B16-22295A3	B16-12477A2	B16-18275A5	B15-16111A2	B15-16909A3	B151968-3	A
B15-14793A3	B15-10252A3	B15-2500A2	B14-20639A3	B14-18506A4	B14-17510A3	B14-10448A3	B14-10264A2	A
B14-6129A1	B14-470A4	B1316294A2	B13-16301A1	B16-4671A8	B17-3130A4	B17-16158A3	B17-4833A2	
B17-8827A2	B17-13681A4	B15-13687A2	B14-2862A1	B16-8048B1	B16-4690A2	B18-9819A12	B18-2711A3	
B18-5245A2	B18-7913A2	B18-4849A3	B17-22849A2	B12-11344B2	B19-1828A3	B19-8483B2	B18-20877A1	
B16-6458A2	B16-20784B2	B16-22295A3	B16-12477A2	B16-18275A5	B15-16111A2	B15-16909A3	B1515968-3	
B15-14793A3	B15-10252A3	B15-2500A2	B14-20639A3	B14-18506A4	B14-17510A3	B14-10448A3	B14-10264A2	
B14-6129A1	B14-470A4	B1316294A2	B13-16301A1	B16-4671A8	B17-3130A4	B17-16158A3	B17-4833A2	
B17-8827A2	B17-13681A4	B15-13687A2	B14-2862A1	B16-8048B1	B16-4690A2	B18-9819A12	B18-2711A3	
B18-5245A2	B18-7913A2	B18-4849A3	B17-22849A2	B12-11344B2	B19-1828A3	B19-8483B2	B18-20877A1	

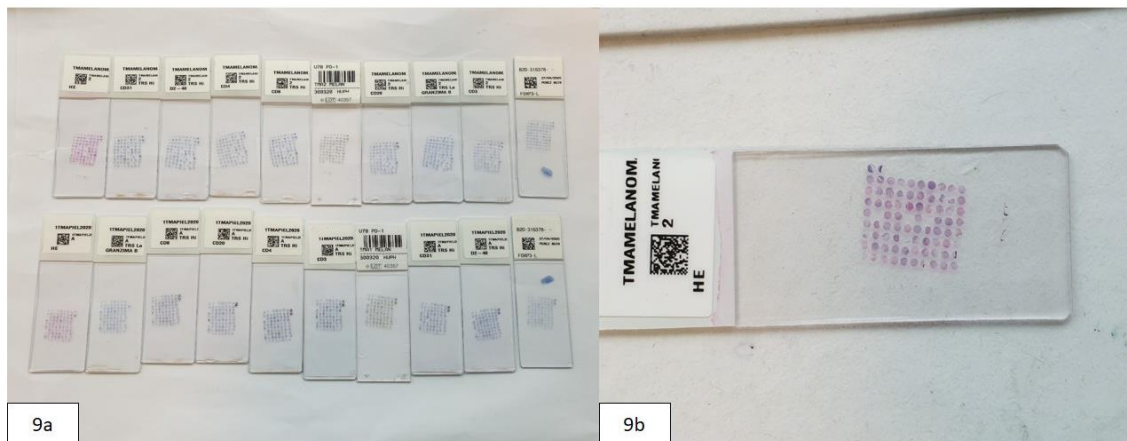
TMA2	mtz							
TMA 2020	MELANOMAS							
B14-7640A5	B14-8882A2	B16-5397A1	B17-20106A2	B16-13611A2	B12-12450A5	B15-17547A1	B15-2107A2	A
B06-11650-1	B07-3666-1	B00-1200	B06-9997-3	B06-3711-1	B08-11350A2	B08-8947A2	B13-8313	A
B15-11272A7	B13-10007A1	B17-4465A5	B15-15969A6	B13-17153	B14-10651a9	B14-16751A6	B14-16751A6	
B14-13291A4	B13-19401A4	B97-3628	B13-319A5	B14-18567B2	B12-10413A1	B19-6836A2	B19-13648A4	
B14-12538A2	B14-16219A1	B08-6579-3	B07-2613	B17-15575A3	B13-15548A2	B19-10806A3	B19-9576D2	
B14-7640A5	B14-8882A2	B16-5397A1	B17-20106A2	B16-13611A2	B12-12450A5	B15-17547A1	B15-2107A2	
B06-11650-1	B07-3666-1	B00-1200	B06-9997-3	B06-3711-1	B08-11350A2	B08-8947A2	B13-8313	
B15-11272A7	B13-10007A1	B17-4465A5	B15-15969A6	B13-17153	B14-10651a9	B18-7680A2	B14-16751A6	
B14-13291A4	B13-19401A4	B97-3628	B13-319A5	B14-18567B2	B12-10413A1	B19-6836A2	B19-13648A4	
B14-12538A2	B14-16219A1	B08-6579-3	B07-2613	B17-15575A3	B13-15548A2	B19-10806A3	B19-9576D2	



g) Corte de las matrices tisulares:

De cada uno de los bloques receptores se realizaron 30 cortes iniciales de 3  $\mu$  cada uno, utilizando la técnica tradicional de microtomía. Después de cortados y montados los bloques se realizó la tinción de hematoxilina – eosina y posteriormente el estudio inmunohistoquímico.

Figura 9a y 9b: Imagen de los cristales TMAs construidos y detalle del mismo.



### 3.7 Valoración de las muestras y valoración de la IHQ:

La evaluación de las muestras se realizó por parte de dos dermatopatólogos expertos e independientes.

La valoración de las tinciones de IHQ se realizó en un microscopio óptico del hospital.

Se evaluaron los TMAS de todos los pacientes a máximo aumento (X400) y se clasificaron según se ha comentado anteriormente.

Para el estudio de los marcadores de interés se realizaron secciones de 3  $\mu$ m de espesor obtenidas de bloques representativos de la lesión, que fueron colocadas sobre portaobjetos especiales con capacidad adhesiva para técnicas de inmunohistoquímica DAKO<sup>®</sup>.

Las secciones se calentaron durante toda la noche en una estufa seca a 56° para garantizar la adhesión del corte histológico, se desparafinaron durante 20 minutos en xilol, se rehidrataron utilizando una serie de alcoholes degradados y por último se lavaron con suero salino.

El desenmascaramiento antigénico se realizó al baño maria (BM) utilizando una solución tamponada a pH9 (*Target Retrieval Solution*, pH9, DAKO<sup>®</sup>). La solución tamponada se introdujo en jarras tipo Coplin<sup>®</sup>. Se introdujeron las muestras en solución de desenmascaramiento una

vez caliente y después se dejó actuar durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un enfriamiento durante 15-20 minutos, se aclararon las secciones en buffer durante 5 minutos y en agua destilada 5 minutos.

Tras esta preparación de las muestras, se programó el inmunoteñidor (Austostainer Plus, DAKO<sup>R</sup>) que sigue los siguientes pasos:

1. Lavado con buffer.
2. Bloqueo de peroxidasa endógena con 150 ml de bloqueante FLEX durante 5 minutos.
3. Aclarado con buffer.
4. Incubación con el anticuerpo primario según protocolo de cada anticuerpo. El tiempo de incubación fue de 30 minutos para todos los marcadores, excepto para el CD4 que fue de 60 minutos.
5. Aclarado con buffer.
6. Polímero marcado con peroxidasa (150 ml de FLEX/HRP<sup>R</sup> en todos los anticuerpos, excepto en CD4 y CD8 que se usó FLEX/Fosfatasa Alcalina), durante 20 minutos.
7. Dos aclarados con buffer.
8. Incubación con cromógeno (300 ml de FLEX DAB<sup>R</sup> en todos los anticuerpos, excepto en CD4 y CD8 que se usó FLEX Fast Red<sup>R</sup>), durante 10 minutos.
9. Aclarado con buffer.
10. Contraintinción con 300 ml de FLEX Hematoxilina, durante 5 minutos.
11. Aclarado con buffer.
12. Aclarado con agua destilada.

Posteriormente se introdujeron los portaobjetos en agua destilada y se deshidrataron en una batería de alcoholes crecientes y xilol, con montaje mediante el montador automático de Leica CV5030<sup>R</sup>. Las secciones correspondientes a los anticuerpos CD4 y CD8 se montaron manualmente en medio acuoso.

A las 40 muestras de melanomas primarios metastásicos así como a los 41 melanomas primarios no metastásicos se les realizó el estudio inmunohistoquímico de los marcadores para el estudio del infiltrado inflamatorio acompañante comentados anteriormente así como los marcadores IHQ para la valoración de la angiogénesis tumoral y linfangiogénesis CD31 y D2-40.

### 3.8 Almacenamiento de datos y estudio estadístico:

Los datos recogidos de todas las variables clínicas, histológicas y de inmunohistoquímica se incluyeron en una base de datos (Microsoft Excel).

Se ha realizado un estudio a doble ciego. Los datos de los pacientes que pertenecían a cada grupo (metastásicos y no metastásicos) fueron codificados. La persona que evaluó las imágenes de la histopatología e hizo las medidas de las variables estudiadas no conocía a qué grupo pertenecía cada paciente. La persona que llevó a cabo el estudio estadístico tampoco sabía qué grupo era cada uno. Sólo tras terminar el análisis estadístico se rompió la codificación.

El estudio estadístico fue realizado con el paquete estadístico R 4.0.1. (R Core Team, 2020) <sup>223</sup>.

Las variables que se expresan en proporciones se describen numéricamente como porcentajes y en gráficas como histogramas. Los datos continuos se describen numéricamente como media y desviación estándar, y en gráficas como mediana, rango intercuartil y extremos.

Para comparar los dos grupos (metastásicos y no metastásicos) se han realizado dos estudios estadísticos. El primero ha consistido en un análisis univariante, mediante una prueba Chi-cuadrado para comparar proporciones en las variables sexo, localización BANS, ganglio centinela, positivo/negativo, linfadenectomía, estado último seguimiento, tipo de melanoma primario, regresión, TIL, nevus previo, invasión linfática, invasión vascular, invasión perineural, metástasis ganglionares y metástasis viscerales; mientras que las variables numéricas como el índice de Breslow y edad al diagnóstico del melanoma primario han sido comparadas con la prueba t de Student.

El segundo análisis ha utilizado las técnicas de Machine Learning Árboles de Regresión y Clasificación (*Classification and Regression Trees – CART*) y Bosques Aleatorios (*Random Forests*) para buscar patrones que permitieran clasificar los pacientes en los dos grupos (metastásicos y no metastásicos). Para estudiar los CART se ha usado la función `rpart` del paquete estadístico `rpart` de Therneau y Atkinson<sup>224</sup>. El número mínimo de observaciones por nodo para intentar una partición ha sido de 15. Los árboles de clasificación y de regresión se dibujaron con la función `rpart.plot` del paquete `rpart.plot` de Milborrow, <sup>225</sup>.

Los datos también fueron analizados con el paquete estadístico `randomForest` para R de Liaw y cols <sup>226</sup>. Este paquete selecciona de forma aleatoria el 66,7% de los resultados como muestra de aprendizaje (*learning sample* en inglés) para fabricar un árbol de clasificación con esos datos. En

este caso se consideró que cada nodo debía tener al menos 5 casos. El resto de los datos (33,3% de los resultados, llamados en estadística “datos fuera de la bolsa” (*out-of-bag*) se emplean para determinar la sensibilidad y especificidad del árbol de clasificación. Este proceso genera un árbol de clasificación cada vez, proceso que fue repetido 1000 veces. El proceso de repetición se llama en inglés *bootstrap*.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1.- Estadística descriptiva y análisis estadístico de las variables incluidas en el estudio**

##### **4.1.1.-Análisis univariante total sin comparar el grupo de los melanomas metastásicos y los no metastásicos:**

En el presente estudio se han incluido 81 pacientes con 81 melanomas primarios de los cuales 38 (46,9%) son hombres y 43 (53,08%) son mujeres. El rango de edad de los pacientes estaba entre 32 y 90 años con una media de 62,55 años.

Se incluyeron 40 pacientes en localizaciones no catalogadas como BANS (49,38%) y 41 en áreas catalogadas como BANS (50,61%), se realizó la técnica de ganglio centinela en 60 pacientes (74,07%) siendo positivo en 13 (16,04%). En el último seguimiento realizado, 15 pacientes (18,51%) habían fallecido por el melanoma, 7 (8,64%) por otras causas, en 12 pacientes perdimos el seguimiento (14,81%) y 47 estaban vivos (58,02%).

Las características histopatológicas de los melanomas incluidos se encuentran recogidas en la tabla 10. Así vemos que se incluyeron 9 LMM (11,11%), 35 MES (43,20%), 8 MLA (9,87%), 25 MN (30,86%) y 4 otros (4,9%). La media del índice de Breslow fue de 3,6 mm; encontramos invasión vascular en 4 pacientes (4,93%), invasión perineural en 6 pacientes (7,4%) y nevus previo en 11 (13,58%). En cuanto al TIL, se encontró un TIL catalogado como ausente en 17 (20,98%), un TIL catalogado como enérgico en 35 (43,20%) y como no enérgico en 29 (35,80%).

En la evolución, 31 pacientes (38,72%) desarrollaron metástasis ganglionares y 24 (29,62%) metástasis viscerales.

Tabla 10: Estadística descriptiva del conjunto de los pacientes:

<u>Variable</u>	<u>Categorías</u>	<u>N (%)</u>
Sexo	Hombre	38 (46,9%)
	Mujer	43 (53,08%)
Localización BANS	No	40 (49,38%)
	Si	41 (50,61%)
Edad	Media	62,55
Ganglio centinela	No	21 (25,9%)
	Si	60 (74,07%)
Positivo/negativo	No	47 (58,02%)
	Si	13 (16,04%)
Linfadenectomía	No	63 (77,77%)
	Si	18 (22,22%)
Estado de último seguimiento	Muerto por melanoma	15 (18,51%)
	Muerto por otras causas	7 (8,64%)
	Perdido	12 (14,81%)
	Vivo	47 (58,02%)
Tipo de melanoma primario	LMM	9 (11,11%)
	MES	35 (43,20%)
	MLA	8 (9,87%)
	MN	25 (30,86%)
	Otros	4 (4,9%)
Regresión	No	46 (56,79%)
	Si	35 (43,20%)
TIL	TIL ausente	17 (20,98%)
	TIL enérgico	35 (43,20%)
	TIL no enérgico	29 (35,80%)
Invasión linfática	No	76 (93,82%)
	Si	5 (6,17%)
Invasión vascular	No	77 (95,06%)
	Si	4 (4,93%)
Invasión perineural	No	75 (92,59%)
	Si	6 (7,40%)
Índice de Breslow	Media	3,6mm
Nevus previo	No	70 (86,41%)
	Si	11 (13,58%)
Metástasis ganglionares	No	49 (60,49%)
	Si	31 (38,27%)
Metástasis viscerales	No	57 (70,37%)
	Si	24 (29,62%)

#### **4.1.2.-Análisis univariante separando el grupo de los melanomas metastásicos y los no metastásicos:**

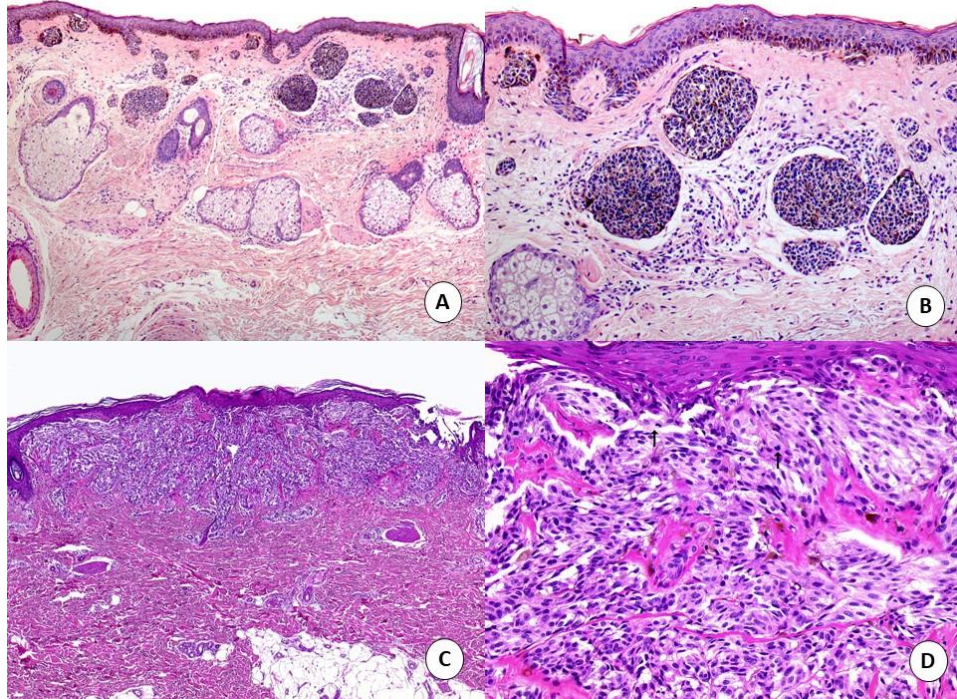
En el grupo de los melanomas metastásicos observamos que 26 pacientes (65%) son varones y 14 mujeres (35%) con una edad media al diagnóstico del tumor primario de 61,5 años. En 24 pacientes (60%) el melanoma estaba localizado en una zona no clasificada de alto riesgo (no BANS). En este grupo de pacientes se realizó ganglio centinela en 19 pacientes (47,5%) y fue positivo en 13 de ellos (68,4%) realizándose linfadenectomía en 18 pacientes (45%) y no realizándose en 22(55%).

En cuanto al estado del último seguimiento disponible 15 pacientes (37,5%) habían fallecido por melanoma, 6 (15%) por otras causas y 12 (30%) continuaban vivos en el momento del análisis.

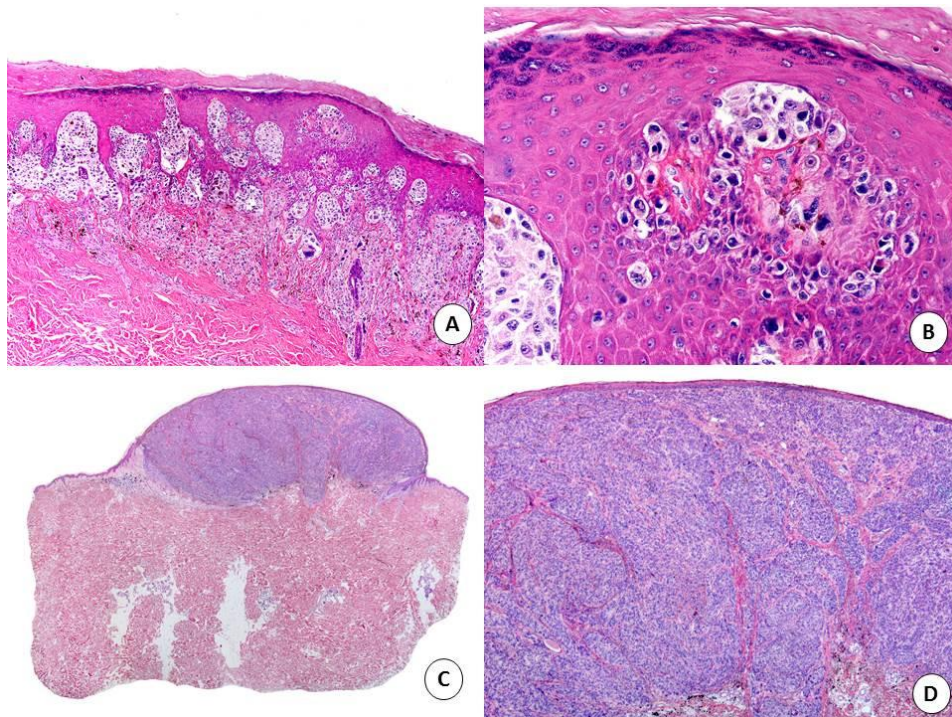
Si nos fijamos en el estudio histológico en este grupo, el tipo de melanoma primario fue en 2 pacientes (5%) de LMM, en 11 (27%) un MES, en 6 (15%) un MLA y 17 (42,5%) un MN. La media del espesor de Breslow fue de 5 mm, se objetivó regresión histológica en 14 pacientes (35%), invasión linfovascular en 3 pacientes (7,5%) e invasión perineural en 5 (12,5%). En 8 pacientes (20%) se identificó nevus asociado. En cuanto al infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL), fue catalogado como ausente en 11 pacientes (27,5%), como enérgico en 9 (22,5%) y como no enérgico en 20 (50%) (Figuras 10, 11).

En la evolución, 32 pacientes (80%) desarrollaron metástasis ganglionares en el tiempo de seguimiento y 24 (60%) metástasis viscerales.





**Figura 10:** Microfotografías de dos ejemplos de melanoma del grupo de melanomas metastásicos, en fase de crecimiento vertical. A y B) Melanoma léntigo maligno (x100 y x200). C y D) Melanoma de extensión superficial (x100 y x200).

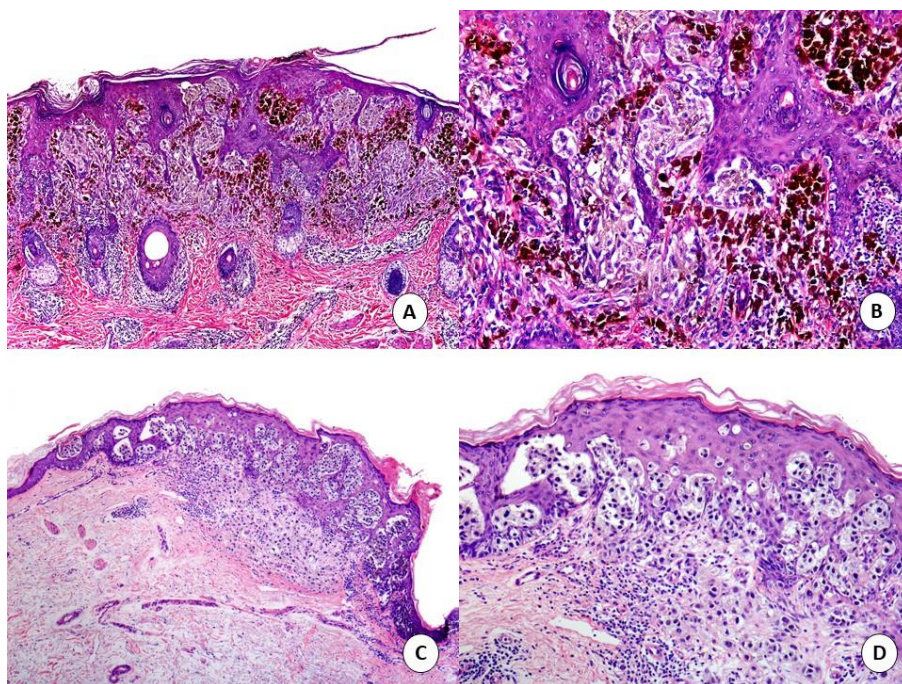


**Figura 11:** Microfotografías de dos ejemplos de melanoma del grupo de melanomas metastásicos, en fase de crecimiento vertical. A y B) Melanoma lentiginoso acral (x100 y x200). C y D) Melanoma nodular (x10 y x200).



En el grupo de los melanomas no metastásicos, 12 pacientes (29,3%) eran varones y 29 mujeres (70 %). En cuanto a la localización del melanoma primario en 16 pacientes (39%) estaba localizado en zonas catalogadas como de alto riesgo y en 25 (61%) en otras áreas. La edad media en este grupo fue de 63,6 años. A todos los pacientes de este grupo se les realizó ganglio centinela siendo negativo en todos ellos (se consideraba criterio de inclusión). En el último seguimiento ninguno de los pacientes había fallecido por el melanoma, 1 paciente había fallecido por otras causas (un accidente de tráfico), en 5 pacientes (12,2%) habíamos perdido el seguimiento y 35 pacientes (85,4%) estaban vivos en el momento del análisis.

Si nos fijamos en el melanoma primario, 7 pacientes (17,1%) tenían un LMM, 24 pacientes (58,5%) un MES, 2 pacientes un MLA (4,9%) y 8 (19,5%) un MN. La media del índice de Breslow en este grupo fue de 2,2 mm. En cuanto a otras características histológicas, no observamos regresión histológica en 20 pacientes (48,8%) y sí en 21(51,2%). Observamos nevus previo en 3 pacientes (7,3%) mientras que en 38 pacientes (92,7%) no lo encontramos. Se objetivó invasión linfática en 2 pacientes (4,9%), invasión vascular en 1 paciente (2,4%) e invasión perineural también en 1 paciente (2,4%). Centrándonos en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL), en 6 pacientes (14,63%) fue catalogado como ausente, en 26 pacientes (63,4%) como enérgico y en 9 pacientes (22%) como no enérgico. En el tiempo de seguimiento no se observó desarrollo de metástasis viscerales ni ganglionares (figs: 12, 13, 14, 15,16).



**Figura 12:** Microfotografías de dos ejemplos de melanoma del grupo de melanomas no metastásicos, en fase de crecimiento vertical. A y B) Melanoma léntigo maligno (x100 y x200). C y D) Melanoma de extensión superficial (x100 y x200).



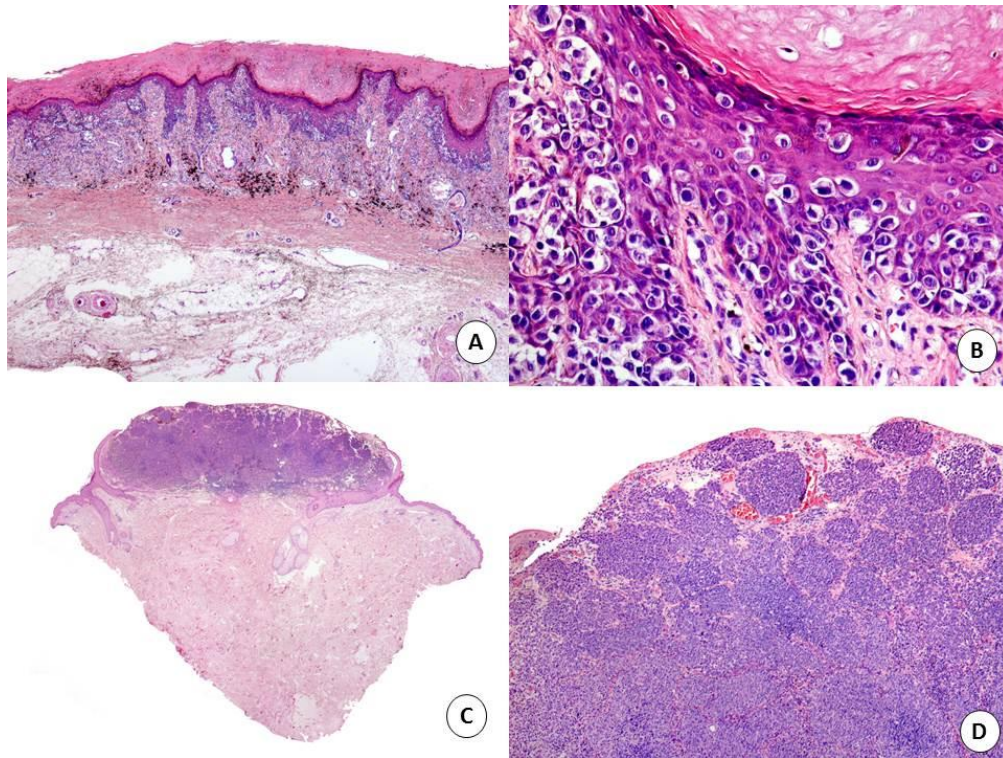


Figura 13: Microfotografías de dos ejemplos de melanoma del grupo de melanomas no metastásicos, en fase de crecimiento vertical. A y B) Melanoma lentiginoso acral (x100 y x400). C y D) Melanoma nodular (x10 y x200).

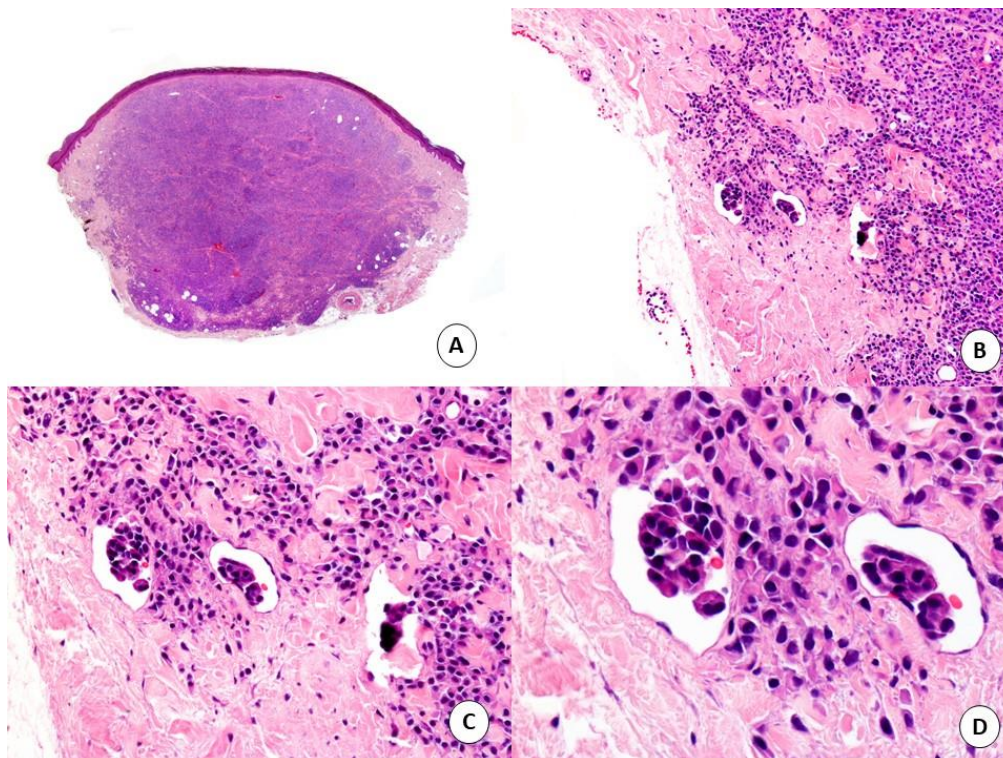
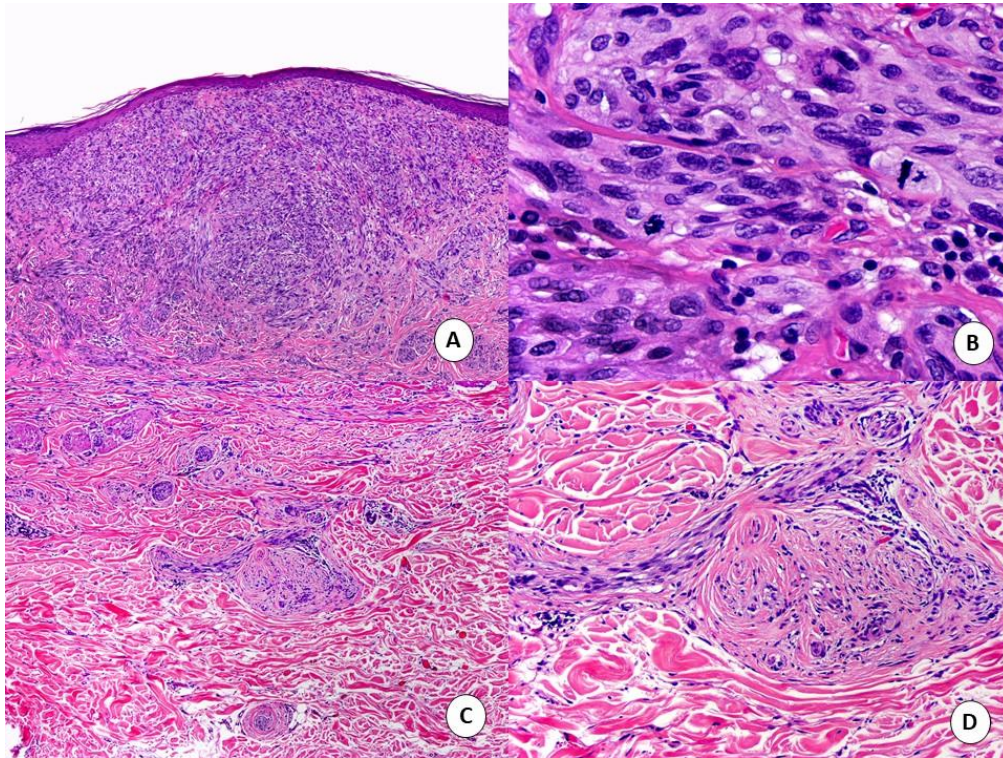
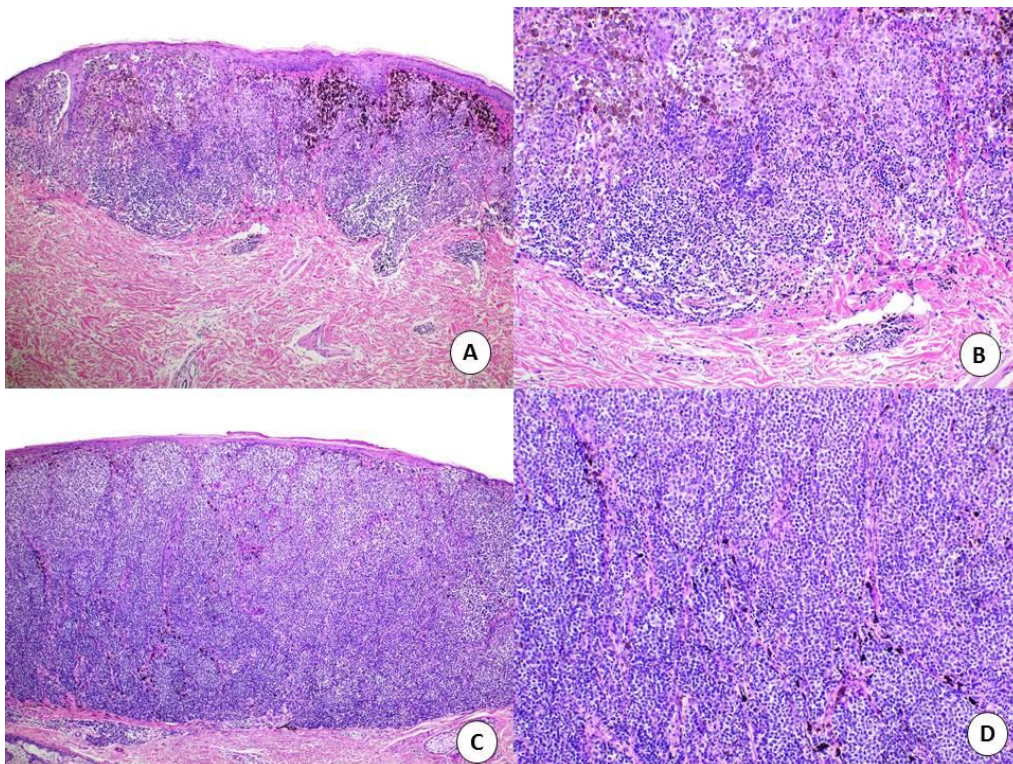


Figura 14: Microfotografías de un ejemplo de un melanoma nodular con invasión linfática. A, B, C y D) Hematoxilina-eosina x10, x100, x200, x400.





**Figura 15:** Microfotografías de un ejemplo de un melanoma de células fusiformes con invasión perineural. A, B, C y D) Hematoxilina-eosina x40, x100, x200, x400.



**Figura 16:** Microfotografías de ejemplos de TIL. A y B) TIL intenso o energético (x100 y x200). C y D) TIL no intenso o no energético (x100 y x200).

#### 4.1.3 Análisis univariante comparando melanomas metastásicos y no metastásicos:

Si comparamos las variables categóricas estudiadas en ambos grupos, vemos que en cuanto a la edad no hay diferencias estadísticamente significativas siendo la media de edad al diagnosticar el tumor primario de 61,5 años en el grupo de los melanomas metastásicos y de 63,5 años en el de los no metastásicos con una  $p=0,56$ . No encontramos tampoco diferencias estadísticamente significativas en cuanto a localización en zonas ocultas (BANS) en ambos grupos ( $p=0,096$ ), sin embargo, sí que observamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo, con un predominio de varones 26 (65%) en el grupo de los metastásicos en comparación con el de los melanomas no metastásicos 12(29,3%) con una  $p=0,003$ .

En cuanto a las características histológicas del melanoma primario, si nos fijamos en el subtipo histológico observamos que en el grupo de los no metastásicos hay mayor número de casos con LMM 7 (17,1%) vs 2 (5%)  $p=0,002$  y de MES 24 (58,5%) vs 11 (27,5%)  $p=0,01$ , mientras que en el grupo de los pacientes con melanoma metastásico hay mayor número de pacientes con MN 17 (42,5%) vs 8 (19,5%) con diferencias estadísticamente significativas. No encontramos diferencias en cuanto a la frecuencia de casos con MLA u otros subtipos de melanoma.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la presencia de nevus previo asociado (aunque hay más casos en el grupo de los metastásicos: 20 frente a 7), regresión histológica, invasión vascular, invasión linfática o perineural. Sin embargo, en nuestra serie los pacientes en el grupo de melanoma metastásico tenían un índice de Breslow de 5 mm de media en comparación con 2,2 mm en el grupo de los no metastásicos con diferencias estadísticamente significativas  $p<0,001$ .

Analizando el TIL observamos en el grupo de los metastásicos un TIL catalogado como ausente en 11 pacientes comparado con 6 pacientes en el grupo de los no metastásicos con una  $p=0,011$ , un TIL catalogado como enérgico en 9 pacientes en el grupo de los metastásicos en comparación con 26 en el grupo de los no metastásicos con diferencias estadísticamente significativas. También vemos que mueren más por otras causas los pacientes del grupo de melanomas metastásicos.

En cuanto al seguimiento, la media fue de 50,5 meses en el grupo de los melanomas metastásicos y de 34,5 meses en el grupo de los no metastásicos pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Los datos que obtuvimos en cuanto a realización de ganglio centinela, positividad del mismo, realización de linfadenectomía y estado en el seguimiento están recogidos en las tablas y figuras (tablas 11 y 12 y figs 17-24).

Tabla 11: Significación estadística de las variables categóricas al comparar los grupos metastásicos y no metastásicos

<b>Categoría</b>	<b>Grupos</b>	<b>MTS</b>	<b>NO MTS</b>	<b>p</b>
SEXO	HOMBRE	26 (65.0)	12 (29.3)	0.003
	MUJER	14 (35.0)	29 (70.7)	
LOC (BANS)	NO	24 (60.0)	16 (39.0)	0.096
	SÍ	16 (40.0)	25 (61.0)	
GANGLIO CENTINELA	NO	21 (52.5)	0 (0.0)	<0.001
	SÍ	19 (47.5)	41 (100.0)	
POSITIVO/NEGATIVO	NO	6 (31.6)	41 (100.0)	<0.001
	SÍ	13 (68.4)	0 (0.0)	
LINFADENECTOMIA	NO	22 (55.0)	41 (100.0)	<0.001
	SÍ	18 (45.0)	0 (0.0)	
ESTADO ÚLTIMO SEGUIMIENTO	MUERTO POR MELANOMA	15 (37.5)	0 (0.0)	<0.001
	MUERTO POR OTRAS CAUSAS	6 (15.0)	1 (2.4)	
	PERDIDO	7 (17.5)	5 (12.2)	
	VIVO	12 (30.0)	35 (85.4)	
TIPO MM PRIMARIO	LMM	2 (5.0)	7 (17.1)	0.002
	MES	11 (27.5)	24 (58.5)	
	MLA	6 (15.0)	2 (4.9)	
	MN	17 (42.5)	8 (19.5)	
	OTROS	4 (10.0)	0 (0.0)	
REGRESIÓN	NO	26 (65.0)	20 (48.8)	0.212
	SÍ	14 (35.0)	21 (51.2)	
TIL	TIL ausente	11 (27.5)	6 (14,63)	0.011
	TIL enérgico	9 (22.5)	26 (63,4)	
	TIL no enérgico	20 (50.0)	9 (22.0)	

<b>Categoría</b>	<b>Grupos</b>	<b>MTS</b>	<b>NO MTS</b>	<b>p</b>
INVASIÓN LINFÁTICA	NO	37 (92.5)	39 (95.1)	0.977
	SÍ	3 (7.5)	2 (4.9)	
INVASIÓN VASCULAR	NO	37 (92.5)	40 (97.6)	0.590
	SÍ	3 (7.5)	1 (2.4)	
INVASIÓN PERINEURAL	NO	35 (87.5)	40 (97.6)	0.192
	SÍ	5 (12.5)	1 (2.4)	
MTS GANGLIONARES	NO	8 (20.0)	41 (100.0)	<0.001
	SÍ	32 (80.0)	0 (0.0)	
MTS VISCERALES	NO	16 (40.0)	41 (100.0)	<0.001
	SÍ	24 (60.0)	0 (0.0)	
NEVUS PREVIO	NO	32 (80.0)	38 (92.7)	0.180
	SÍ	8 (20.0)	3 (7.3)	
EDAD DIAG PRIMARIO	Media (SD)	61.5 (17.2)	63.6 (16.0)	0.565
ÍNDICE DE BRESLOW	Media (SD)	5.0 (3.5)	2.2 (1.8)	<0.001
TIEMPO DE SEGUIMIENTO	Media (SD)	50.5 (54.3)	34.5 (18.5)	0.084

Tabla 12: Significación estadística de las variables categóricas con varias categorías al comparar los grupos metastásico y no metastásico:

<b>variable</b>	<b>categoría</b>	<b>pvalor</b>
ESTADO.ÚLTIMO.SEGUIMIENTO	MUERTO POR MELANOMA	0.00
	MUERTO POR OTRAS CAUSAS	0.11
	PERDIDO	0.72
	VIVO	0.00
TIPO.MM.PRIMARIO	LMM	0.17
	MES	0.01
	MLA	0.25
	MN	0.05
	OTROS	0.12



Figura 17: Diagrama de barras distribución por sexo

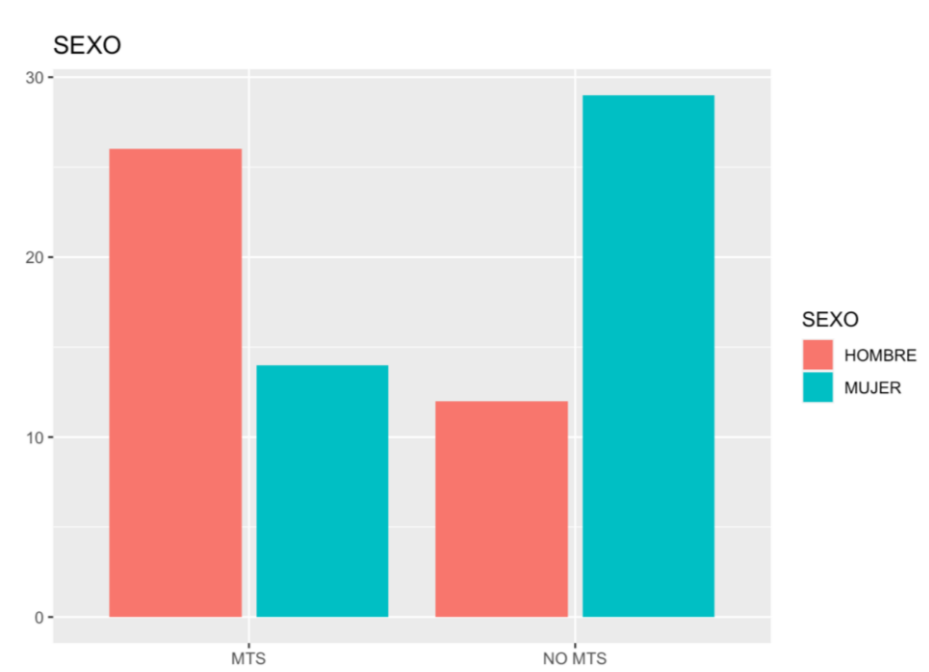


Figura 18: Diagrama de barras, localización melanomas

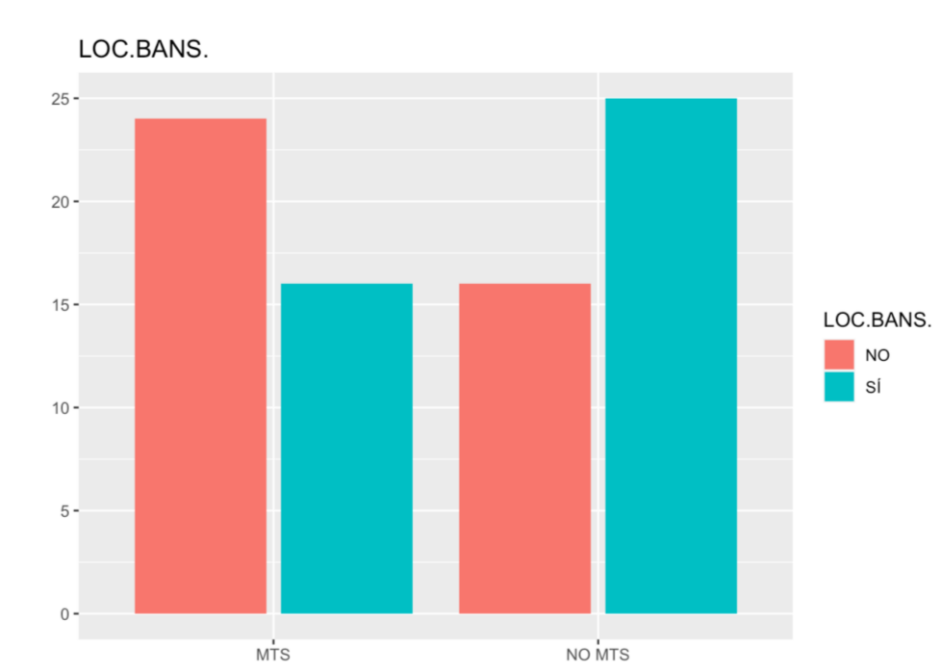




Figura 19: Diagrama de barras, estado en el último seguimiento

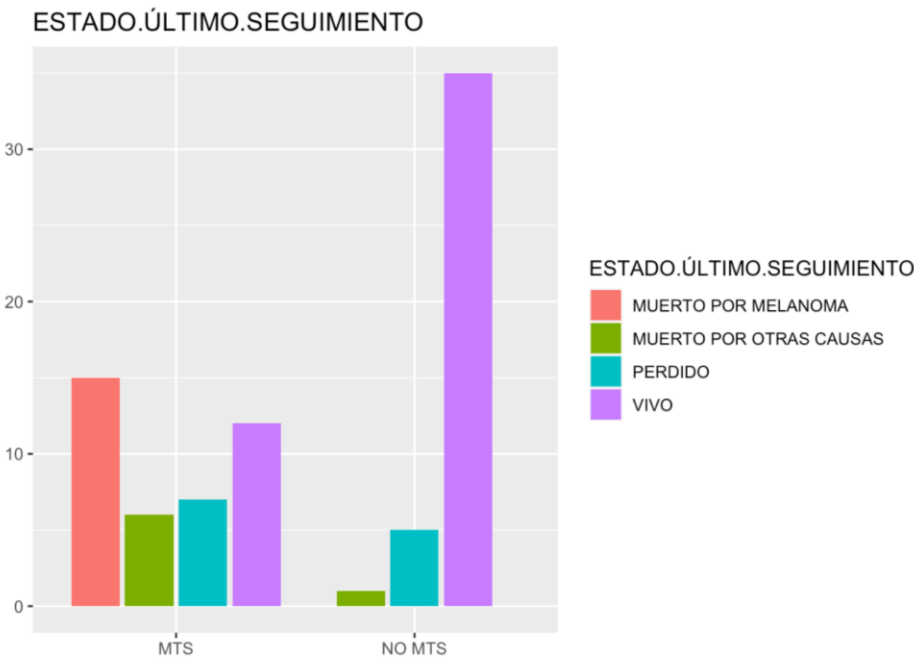


Figura 20: Diagrama de barras, subtipo histológico de melanoma primario.

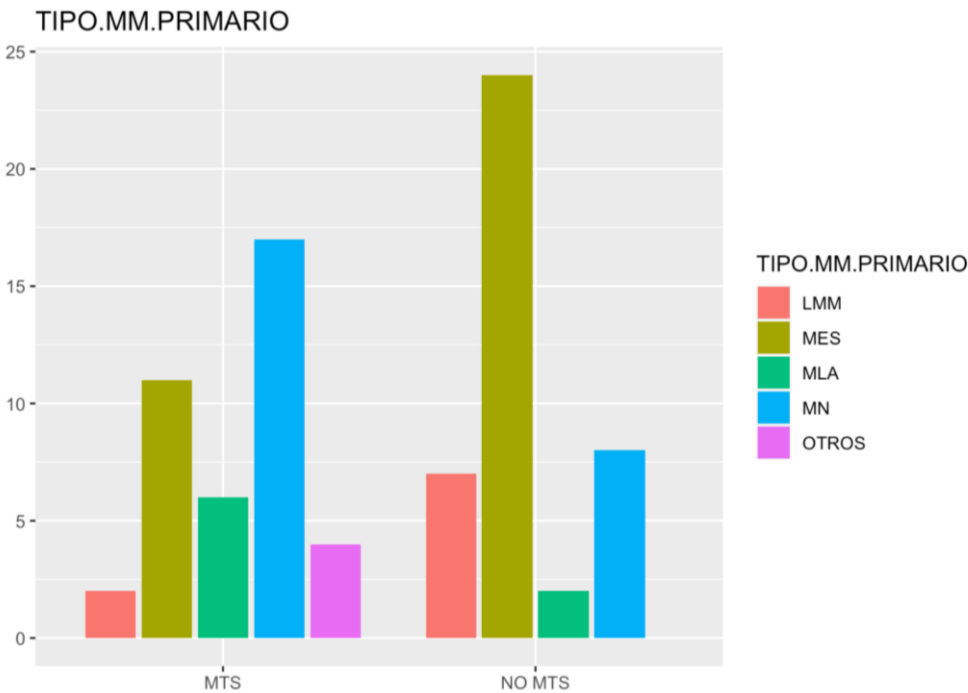


Figura 21: Diagrama de barras, regresión histológica

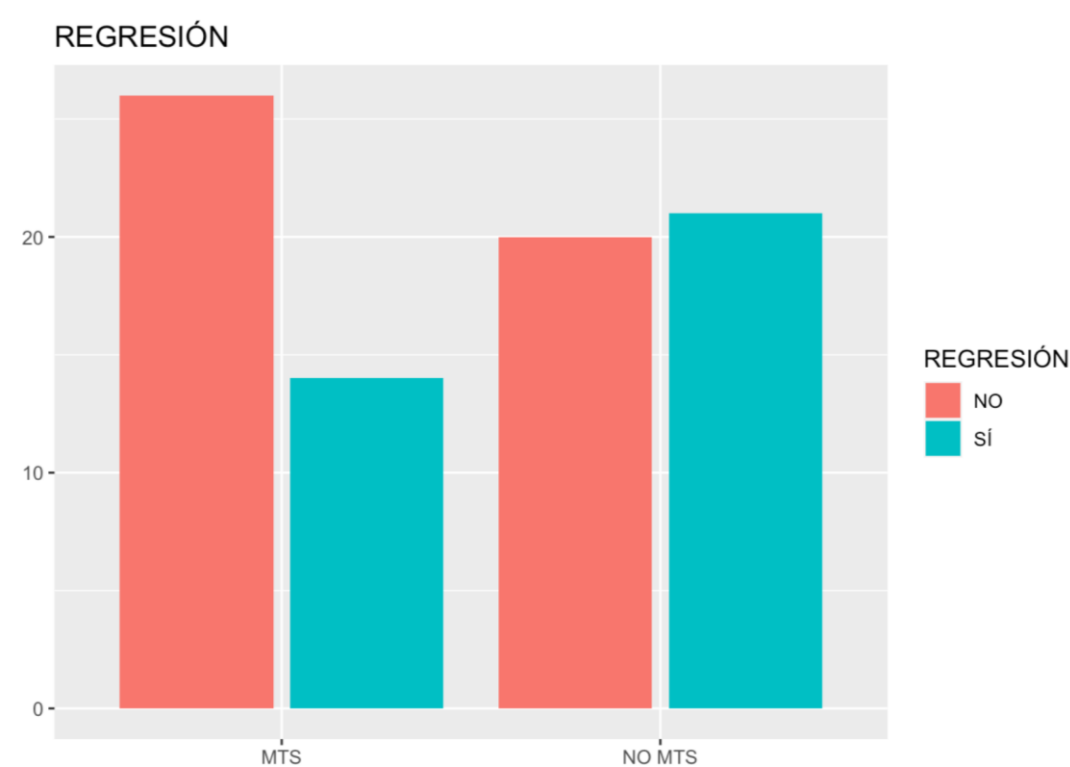


Figura 22.- Diagrama cajas y bigotes de edad al diagnóstico del melanoma primario

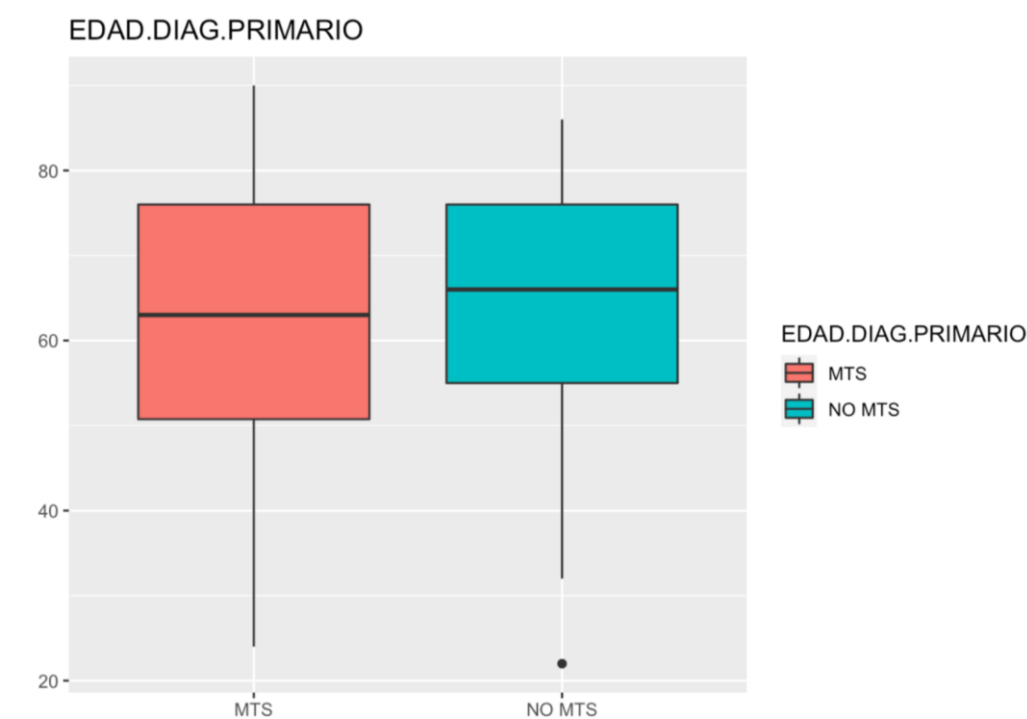


Figura 23: Diagrama de cajas y bigotes de índice de Breslow en el melanoma primario

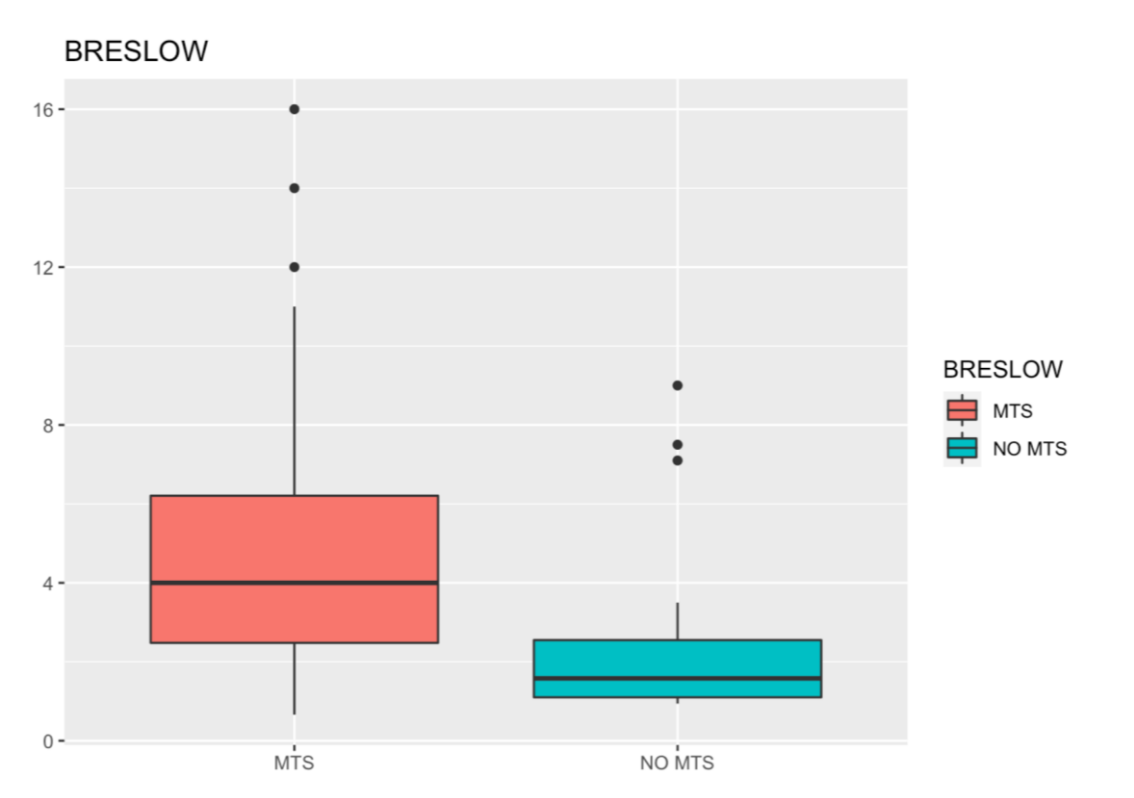
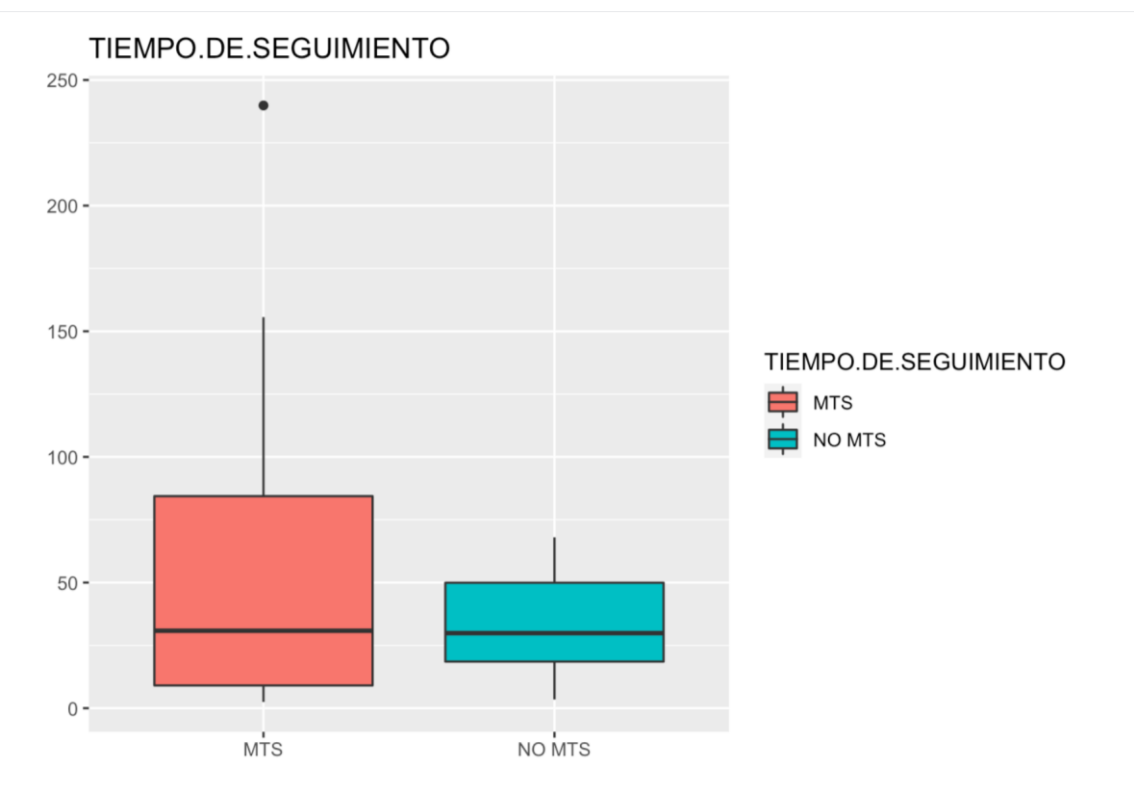


Figura 24: Diagrama de cajas y bigotes de tiempo de seguimiento



#### **4.2.- Estudio de las poblaciones linfocitarias:**

Para el análisis de las poblaciones linfocitarias hemos realizado una agrupación de las categorías, de tal manera que en el caso de la valoración IHQ de CD3, CD4, CD8, CD20, FOXP3 y PD1, las muestras de TMA que fueron catalogadas por los dermatopatólogos como expresión 0 (0-10% positividad) o +1 (10-25% de positividad) se clasificaron como expresión BAJA y las que fueron catalogadas como 2 (25-50% de positividad) o 3 (>50% positividad) se agruparon como expresión ALTA.

Señalar que como se tomaron 2 TMAs de cada muestra de melanoma de cada paciente, para realizar el análisis estadístico se procedió a realizar una media de los resultados encontrados.

Aunque se realizó el estudio de la expresión de granzima, no se incluyó en el análisis ya que de los 162 TMAs estudiados sólo se encontró expresión en 2 de ellos y una expresión catalogada como baja.

##### **4.2.1 Estadística descriptiva de las poblaciones linfocitarias:**

###### **4.2.1.1 Comparación de las poblaciones linfocitarias de los grupos metastásico y no metastásico:**

Centrándonos en el estudio de las poblaciones linfocitarias vemos que en el grupo de los metastásicos hay una expresión de CD3 catalogada como alta en 28 pacientes (36,4%) en comparación con 39 pacientes (50%) en el grupo de los melanomas no metastásicos, y aunque se observa en el grupo de los no metastásicos una mayor expresión de CD3, en nuestra serie las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas  $p=0,121$ .

En cuanto a la expresión de CD4, si comparamos ambos grupos, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas con  $p<0,001$  de tal manera que en el grupo de los metastásicos obtuvimos una expresión de CD4 alta en 7 pacientes (9,1%) y baja en 70 pacientes (90,9%), mientras que en el grupo de los no metastásicos obtuvimos una expresión de CD4 alta en 28 pacientes (35,4%) y baja en 51 (64,6%). También encontramos diferencias marcadas estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de CD8, de tal manera que en el grupo de metastásicos encontramos una expresión de CD8 alta en 12 pacientes (15,8%) y baja en 64 pacientes (84,2%) mientras que en el grupo de los no metastásicos vemos una expresión alta en 45 pacientes (57%) y baja en 34 (43%). Las diferencias son especialmente marcadas en

cuanto a la expresión de este marcador IHQ en ambos grupos, como se puede ver en las figura 35 y en la tabla 13.

En la expresión de CD20 y FOXP3 no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (ver tabla 13).

Si nos fijamos en la expresión de PD1 también encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, de tal manera que la expresión de PD1 es alta en un 29% de los metastásicos en comparación con una expresión alta de PD1 en el 14% de los no metastásicos.

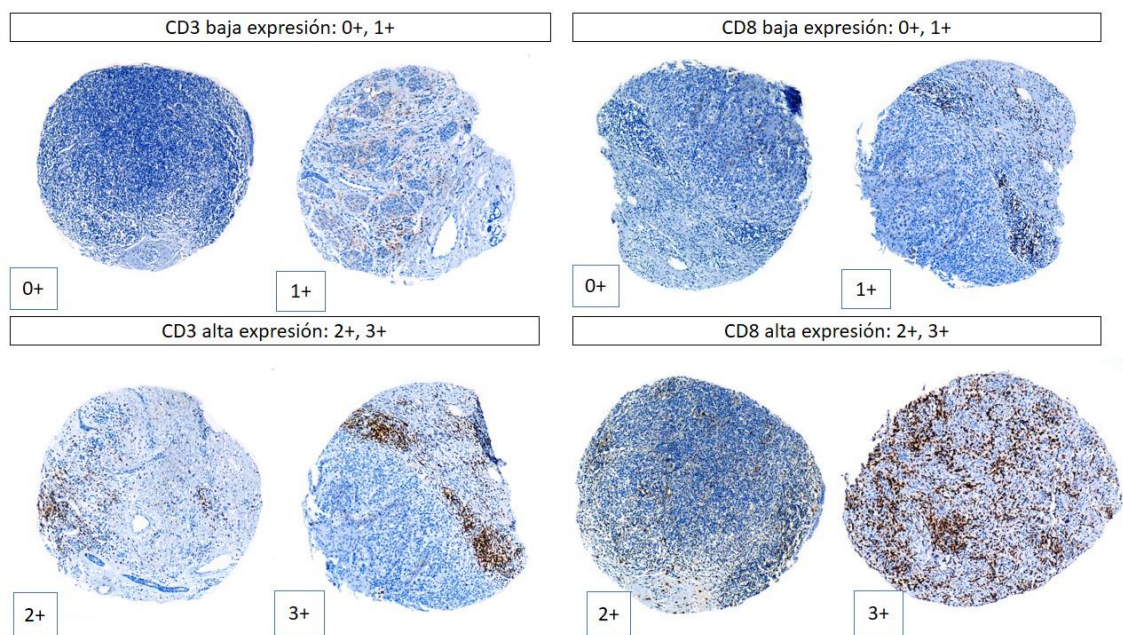
En cuanto a la neovascularización, evaluada mediante la expresión de CD31 encontramos en el grupo de los metastásicos una media de 16,9 vasos por campo evaluado en comparación con 9,4 en el grupo de los no metastásicos con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al evaluar la densidad de vasos linfáticos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tabla 13: Comparación de las poblaciones linfocitarias de los grupos metastásicos y no metastásicos

Variable	Categoría	MTS	NO MTS	p
CD3	ALTO	28 (36.4)	39 (50.0)	0.121
	BAJO	49 (63.6)	39 (50.0)	
CD4	ALTO	7 (9.1)	28 (35.4)	<0.001
	BAJO	70 (90.9)	51 (64.6)	
CD8	ALTO	12 (15.8)	45 (57.0)	<0.001
	BAJO	64 (84.2)	34 (43.0)	
CD20	ALTO	0 (0.0)	5 (6.3)	0.074
	BAJO	77 (100.0)	74 (93.7)	

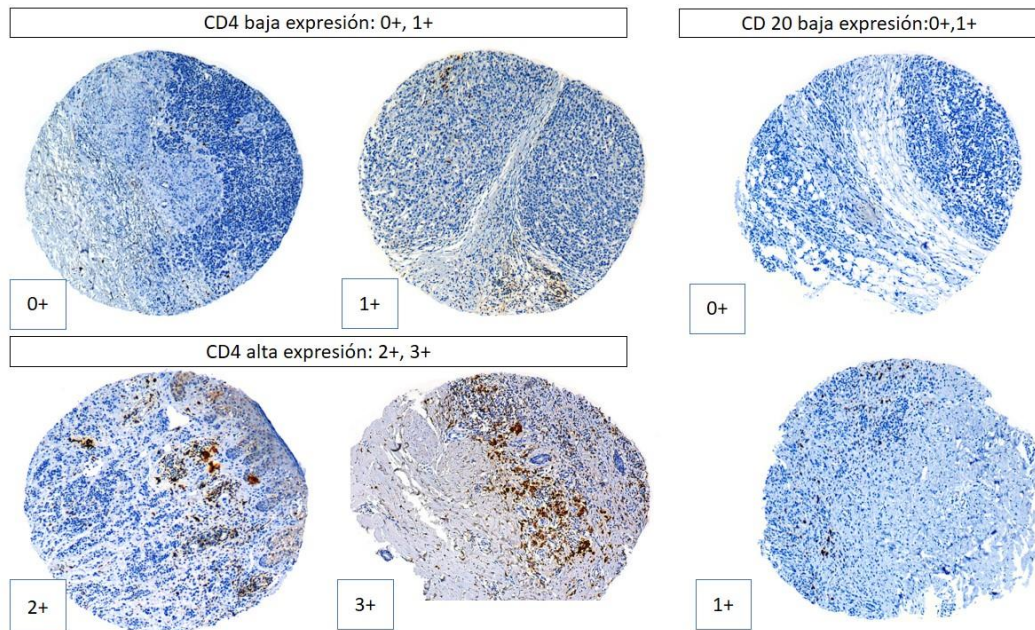
Variable	Categoría	MTS	NO MTS	p
FOXP3	ALTO	12 (15.2)	5 (6.2)	0.117
	BAJO	67 (84.8)	75 (93.8)	
PD1	ALTO	29 (38.7)	14 (17.7)	0.007
	BAJO	46 (61.3)	65 (82.3)	
CD31	Mean (SD)	16.9 (7.2)	9.4 (5.2)	<0.001
D2.40	Mean (SD)	4.4 (2.5)	4.5 (2.1)	0.718

Figura 25: Ejemplos CD3 y CD8 en el grupo de los metastásicos



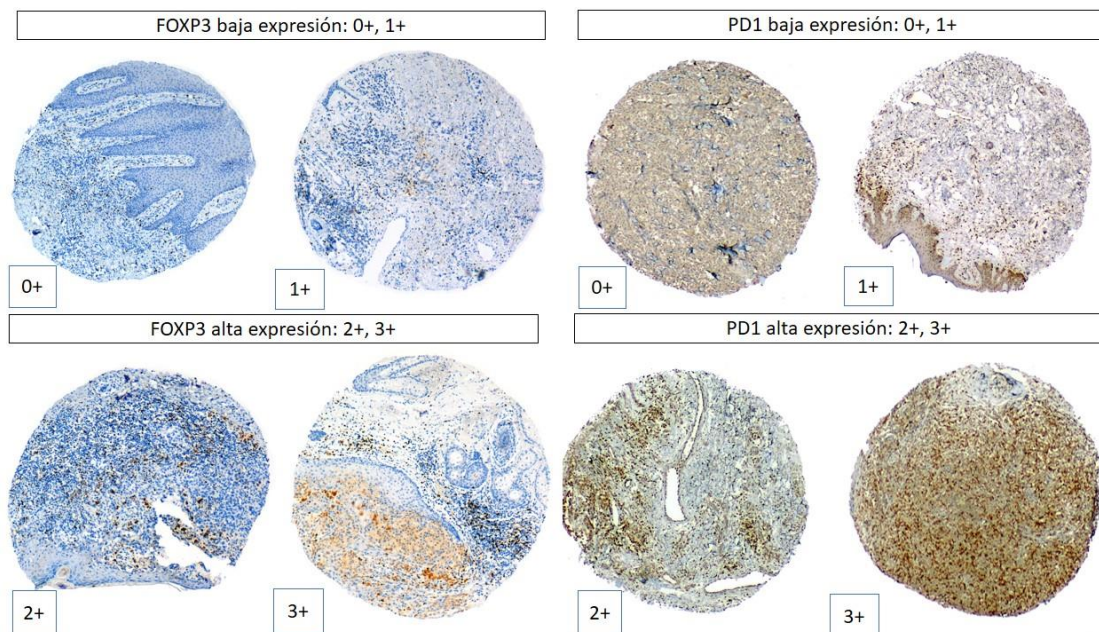
Pie de figura 25: Expresión de CD3 y CD8 en melanomas metastásicos, a la izquierda expresión de CD3 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de CD8 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior).

Figura 26: Ejemplos CD20 y CD4 en el grupo de los metastásicos



Pie de figura 26: Expresión de CD4 y CD20 en melanomas metastásicos, a la izquierda expresión de CD4 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de CD20 (catalogada como baja en imagen superior e inferior).

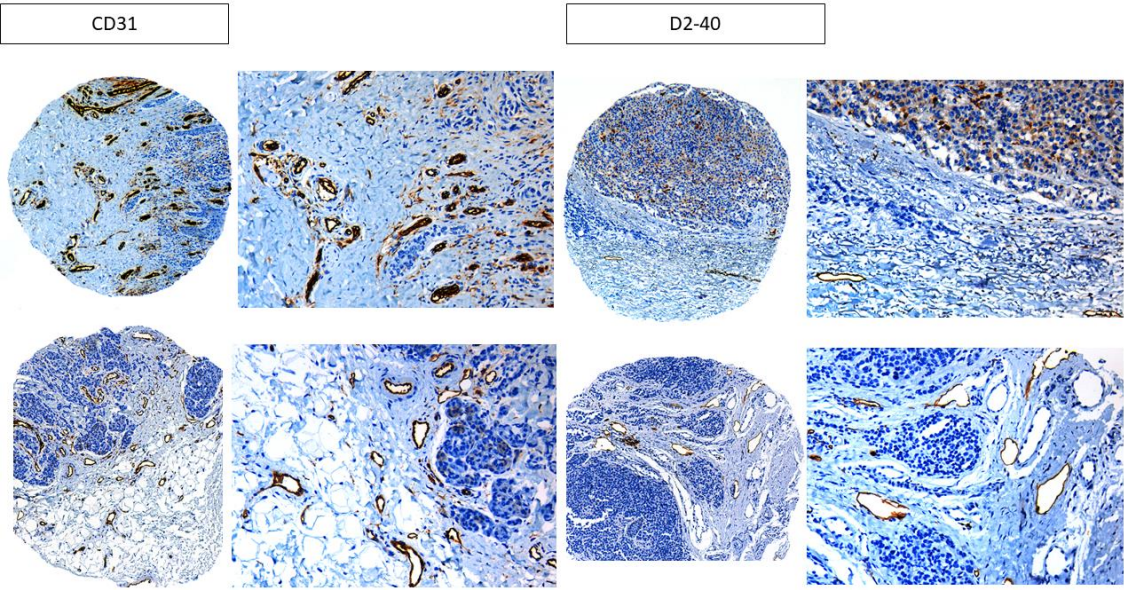
Figura 27: Ejemplos FOXP3 y PD1 en el grupo de los metastásicos



Pie figura 27: Expresión de FOXP3 y PD1 en melanomas metastásicos, a la izquierda expresión de FOXP3 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de PD1 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior).

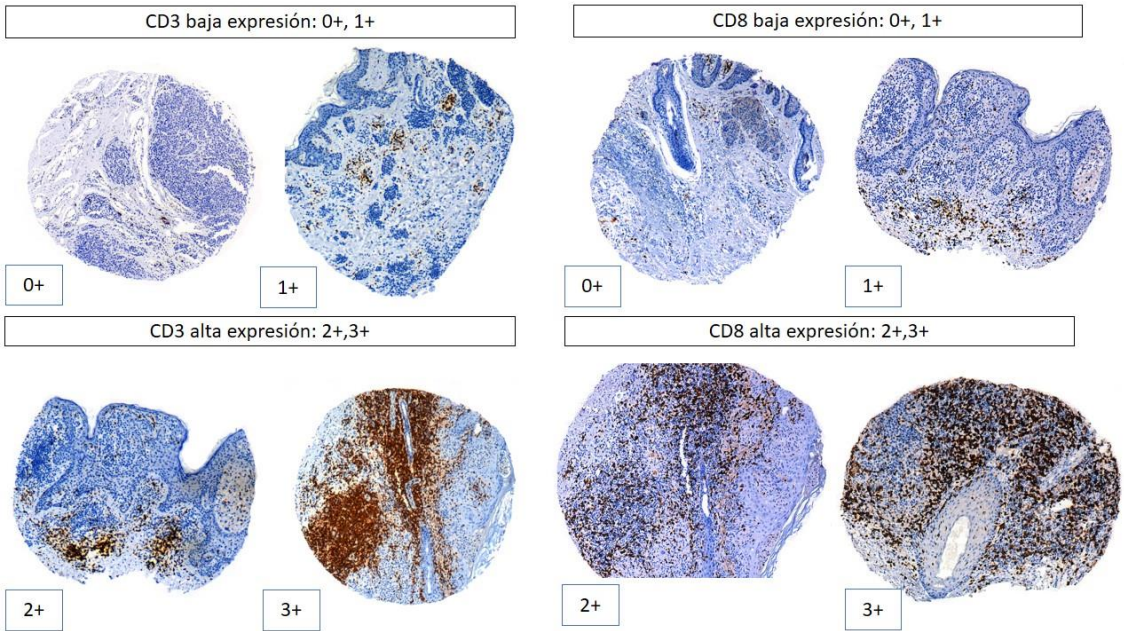


Figura 28.- Ejemplos de CD31 y D2-40 en el grupo de los metastásicos



Pie figura 28: 2 ejemplos de TMAS de melanomas metastásicos con las tinciones de CD31 para endotelio y D2-40 para vasos linfáticos con los vasos resaltados en negro.

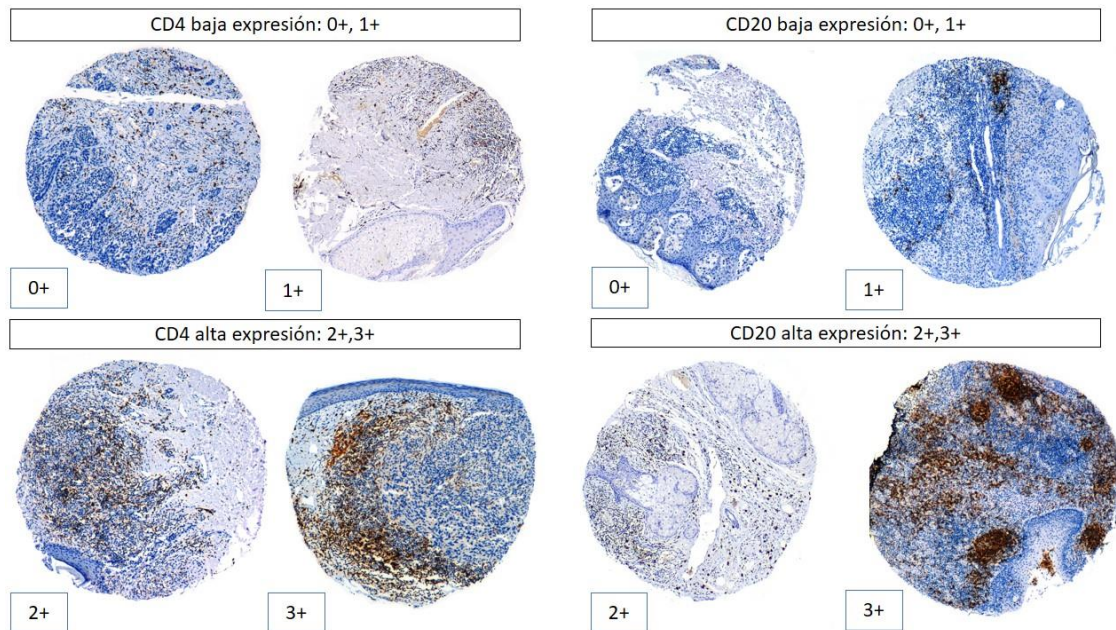
Figura 29.- Ejemplos de CD3 y CD8 en el grupo de los no metastásicos



Pie figura 29: Expresión de CD3 y CD8 en melanomas no metastásicos, a la izquierda expresión de CD3 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de CD8 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior).

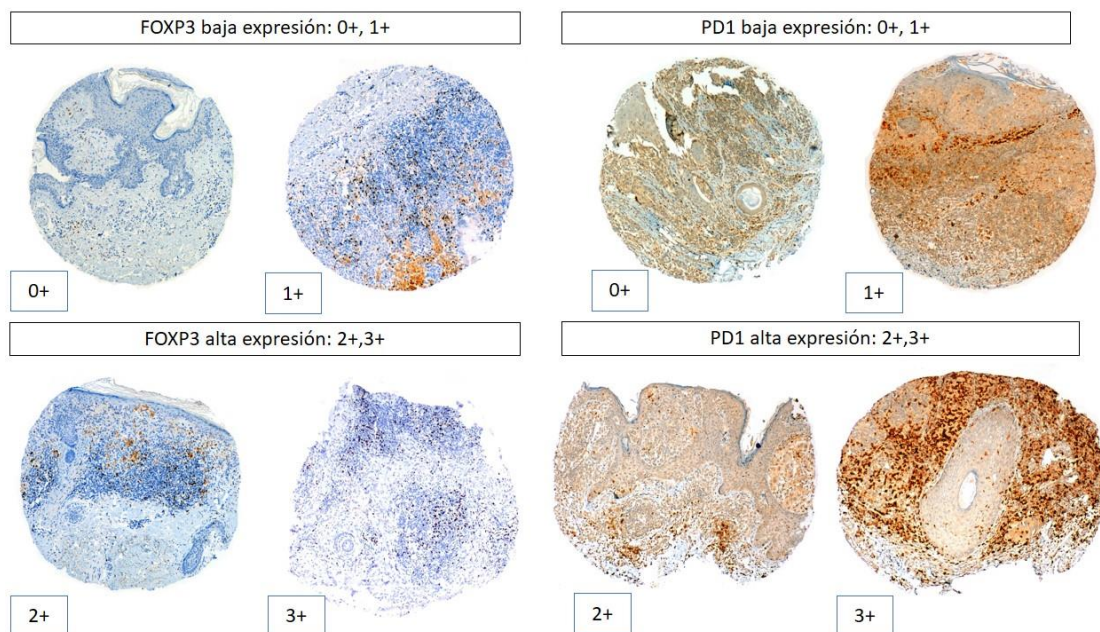


Figura 30.- Ejemplos CD4 y CD20 en el grupo de los no metastásicos



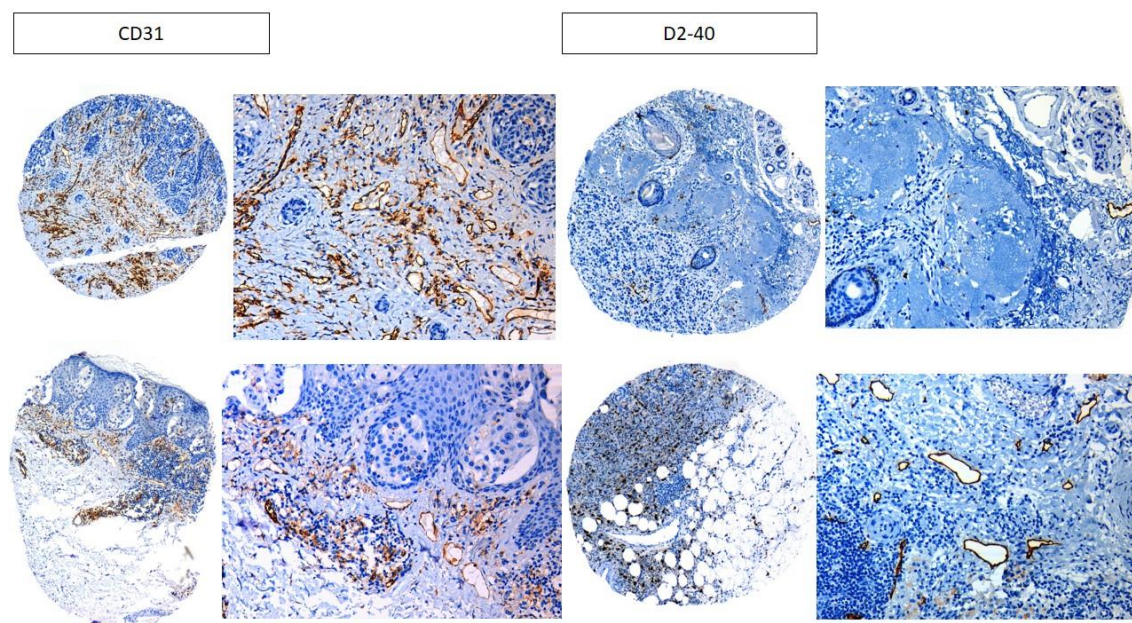
Pie figura 30: Expresión de CD4 y CD20 en melanomas metastásicos, a la izquierda expresión de CD4 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de CD20 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior).

Figura 31.- Ejemplos FOXP3 y PD1 en el grupo de los no metastásicos



Pie figura 31: Expresión de FOXP3 y PD1 en melanomas no metastásicos, a la izquierda expresión de FOXP3 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior), a la derecha expresión de PD1 (catalogada como baja en imagen superior y como alta en imagen inferior).

Figura 32.- Ejemplos CD31 y D2-40 en el grupo de los no metastásicos



Pie figura 32: 2 ejemplos de TMAS de melanomas no metastásicos con las tinciones de CD31 para endotelio y D2-40 para vasos linfáticos con los vasos resaltados en negro.

#### 4.2.1.2 Significación de las variables estudiadas mediante inmunohistoquímica incluyendo como variable el índice de Breslow:

Para responder a la pregunta si la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos se modificaba en función del índice de Breslow que tuviera el melanoma, realizamos un sub-análisis en este sentido cuyos resultados están resumidos en la tabla (Tabla 14).

Así podemos ver que los pacientes que tenían expresión de CD3 catalogada como alta tenían una media de índice de Breslow de 2,9 mm, mientras que los pacientes con una expresión de CD3 catalogada como baja tenían una media de índice de Breslow de 4 mm con diferencias estadísticamente significativas  $p=0,010$ .

En cuanto a la expresión de CD4 catalogada como alta, la media de índice de Breslow de los pacientes fue de 2,5 mm en comparación con los 3,8 mm en los pacientes catalogada como expresión baja y las diferencias fueron estadísticamente significativas. Asimismo encontramos diferencias muy marcadas en cuanto a la expresión de CD8 de manera que la media de índice de Breslow fue de 2,4 mm en los pacientes catalogados como CD8 alto y de 4,1 mm en los catalogados como CD8 bajo con una  $p<0,001$ .

En este caso sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de CD20 de tal manera que los pacientes con expresión alta de CD20 tenían una media de índice de Breslow de 1,7 mm mientras que los que tenían una expresión baja tenían una media de índice de Breslow de 3,6 mm.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el índice de Breslow en cuanto a la expresión alta/ baja de FOXP3 y en cuanto a la expresión de PD1, la media de índice de Breslow en los catalogados como expresión alta fue mayor que en los de expresión baja (4,1 mm vs 3,1 mm) y las diferencias casi alcanzaron significación estadística.

Tabla 14: Significación de las variables estudiadas mediante inmunohistoquímica incluyendo como variable el índice de Breslow:

Variable	Categoría	Unidad	Valor (mm)	p
CD3	ALTO	Media (sd)	2.9 (2.1)	0.010
	BAJO	Media (sd)	4.0 (3.4)	
CD4	ALTO	Media(sd)	2.5 (2.0)	0.003
	BAJO	Media (sd)	3.8 (3.1)	
CD8	ALTO	Media (sd)	2.4 (1.8)	<0.001
	BAJO	Media (sd)	4.1 (3.3)	
CD20	ALTO	Media (sd)	1.7 (0.7)	0.001
	BAJO	Media (sd)	3.6 (3.1)	
FOXP3	ALTO	Mean (sd)	3.9 (2.8)	0.559
	BAJO	Mean (sd)	3.5 (3.1)	
PD1	ALTO	Media(sd)	4.1 (3.1)	0.059
	BAJO	Media (sd)	3.1 (2.5)	
CD31	[1.0,31.0]	Media (sd)	3.6 (3.1)	0.023
D2.40	[1.0,10.0]	Media (sd)	3.6 (3.1)	0.00

#### 4.2.1.3 Comparación de edad en función de las poblaciones linfocitarias

Para responder a la pregunta de si obteníamos diferente expresión de los marcadores en función de la edad de los pacientes, hicimos una estratificación en función de la edad, y como vemos en la tabla 15, no encontramos diferencias que alcanzaran significación estadística en ninguno de los grupos.

Tabla 15: Comparación de edad en función de las poblaciones linfocitarias.

<b>Variables</b>	<b>Categorías</b>	<b>unidad</b>	<b>Valor(años)</b>	<b>p</b>
CD3	ALTO	Media(sd)	60.8 (16.2)	0.233
	BAJO	Media (sd)	64.1 (17.0)	
CD4	ALTO	Media (sd)	63.3 (13.9)	0.831
	BAJO	Media(sd)	62.7 (17.4)	
CD8	ALTO	Media (sd)	61.3 (15.8)	0.406
	BAJO	Media (sd)	63.6 (17.3)	
CD20	ALTO	Media(sd)	66.8 (5.4)	0.167
	BAJO	Media (sd)	62.5 (16.9)	
FOXP3	ALTO	Media (sd)	62.3 (19.9)	0.952
	BAJO	Media (sd)	62.6 (16.1)	
PD1	ALTO	Media (sd)	60.0 (16.8)	0.251
	BAJO	Media (sd)	63.5 (16.6)	
CD31	[1.0,31.0]	Media (sd)	62.6 (16.5)	0.792
D2.40	[1.0,10.0]	Media (sd)	62.6 (16.5)	0.060

Figura 33: Diagrama de barras CD3 en metastásicos y no metastásicos

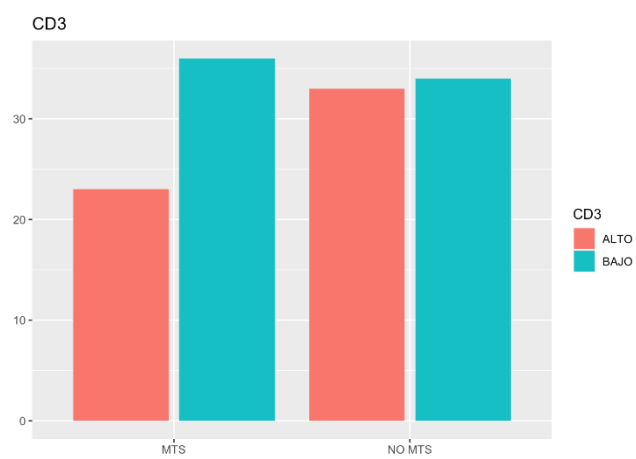


Figura 34: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos CD4

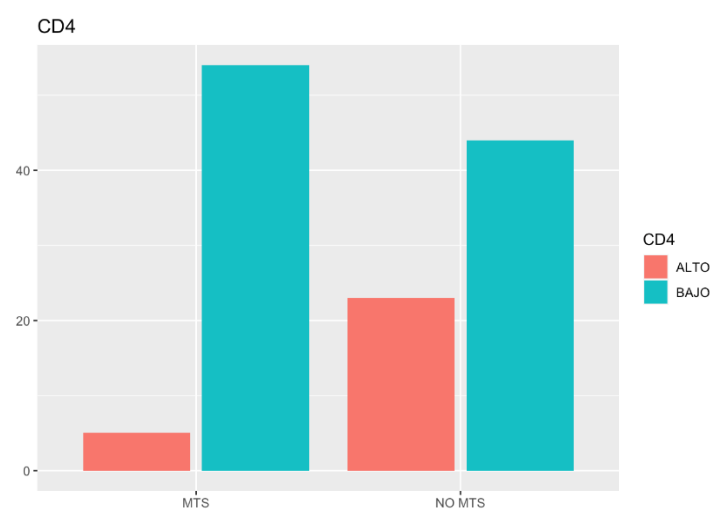


Figura 35: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos CD8

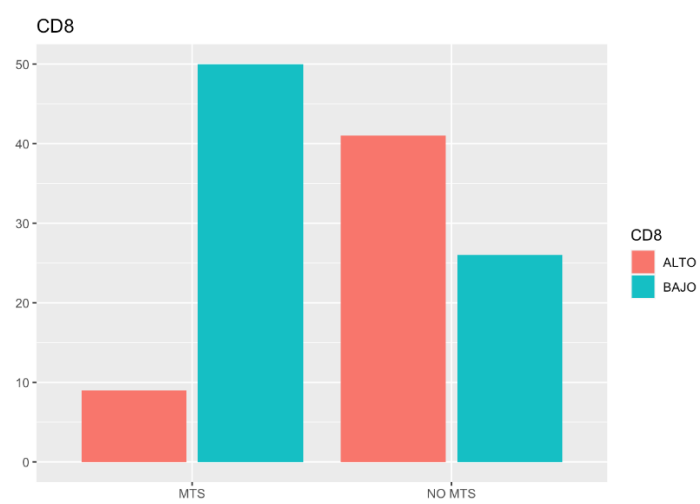


Figura 36: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos CD20

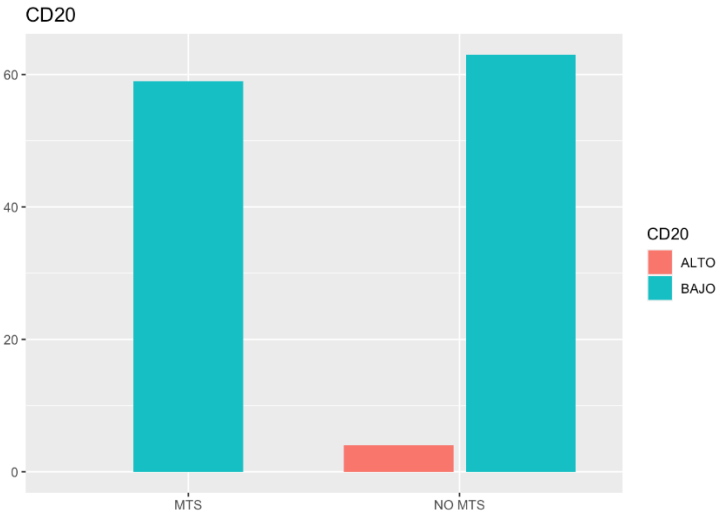


Figura 37: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos FOXP3

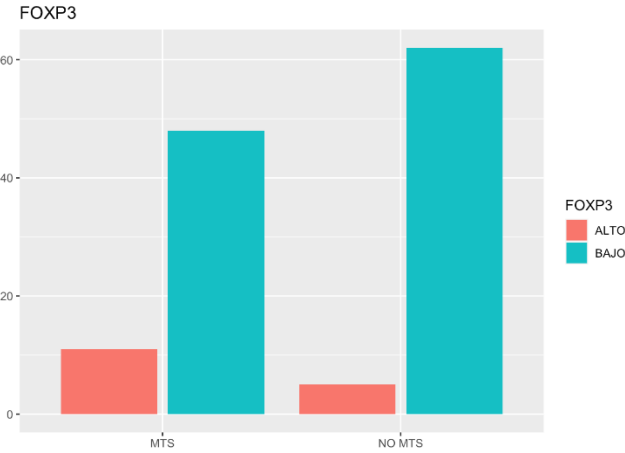


Figura 38: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos PD1

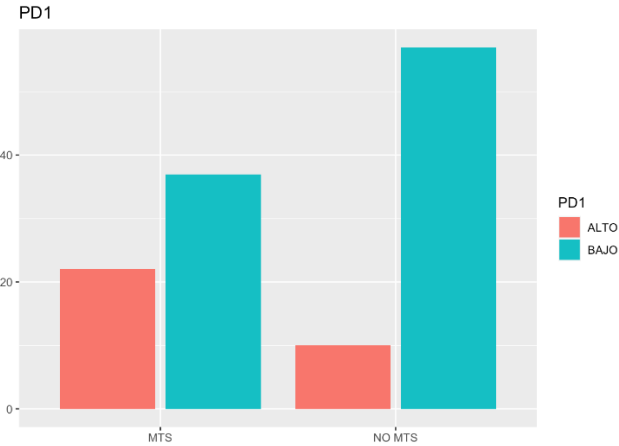


Figura 39: Diagrama caja-bigotes metastásicos y no metastásicos

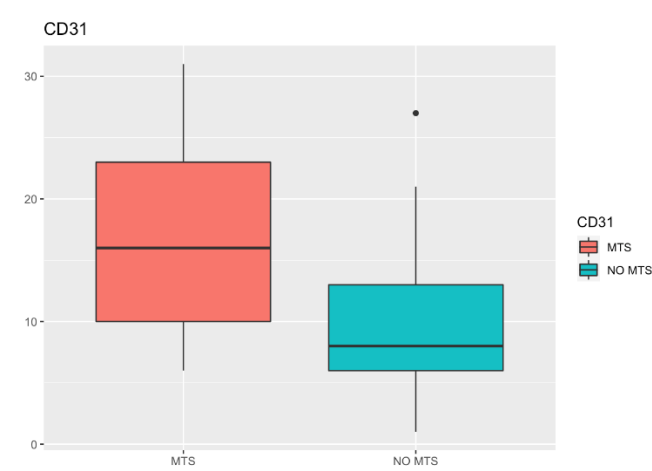


Figura 40: Diagrama de barras metastásicos y no metastásicos

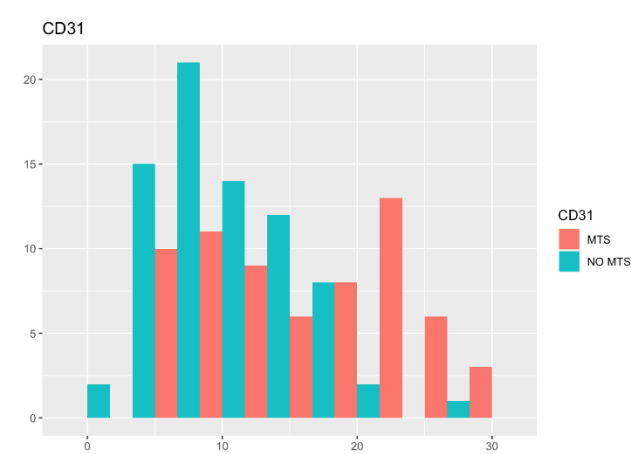


Figura 41: Diagrama cajas-bigotes D2-40

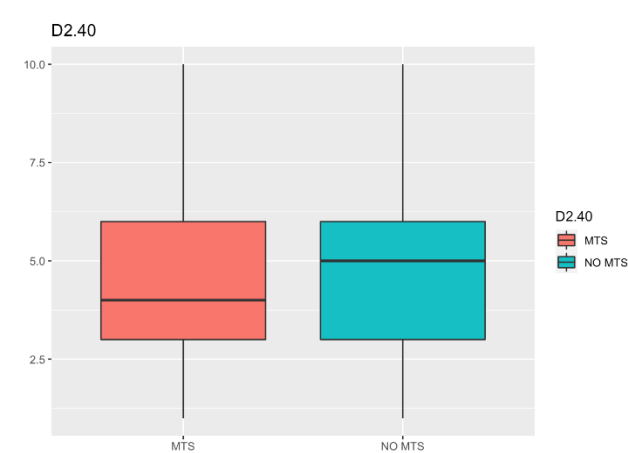
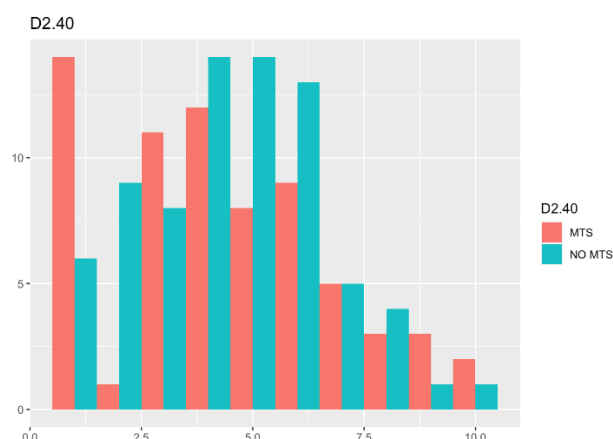




Figura 42: Diagrama de barras D2-40 metastásicos y no metastásicos



#### 4.2.2 Árboles y bosques de clasificación:

En nuestro análisis de estos dos grupos nos preguntamos si con toda esta información de las poblaciones linfocitarias y la vascularización en nuestra muestra de pacientes podríamos clasificarlos a priori como metastásicos o no metastásicos, es decir si realizando el análisis de CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD20, CD31 y D2-40 en las muestras de los melanomas primarios podríamos predecir si van a desarrollar metástasis o no. Para esto, en la segunda parte del análisis estadístico utilizamos las técnicas de inteligencia artificial de *Machine Learning* Árboles de Regresión y Clasificación (*Classification and Regression Trees* – CART) y Bosques Aleatorios (*Random Forests*). Estas engloban un conjunto de técnicas supervisadas no paramétricas que consiguen segmentar el espacio de los predictores en regiones simples, dentro de las cuales es más sencillo manejar las interacciones y predecir la variable respuesta.

##### 4.2.2.1 Árbol de clasificación metástasis:

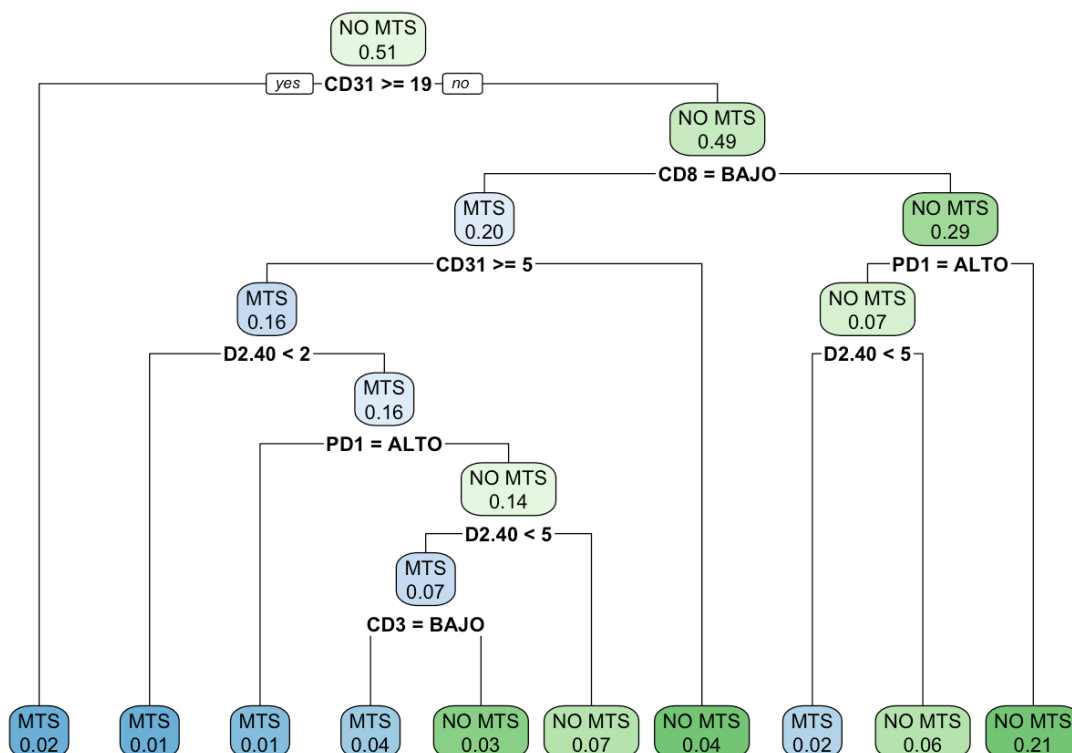
Este primer árbol da respuesta a la pregunta ¿va mi paciente a desarrollar metástasis en función de los resultados que obtengamos en el estudio inmunohistoquímico del tumor primario?

De tal manera que podríamos decir que si en un paciente encontramos  $CD31 \geq 19$  el paciente va a desarrollar metástasis, en el caso de que  $CD31 < 19$  habría que continuar realizando técnicas de IHQ, por ejemplo

\*\*\*  $CD31 < 19 + CD8 \text{ bajo} + CD31 \geq 5 + D240 < 2$ : el paciente va a desarrollar metástasis



Figura 43: Árbol de clasificación de metástasis

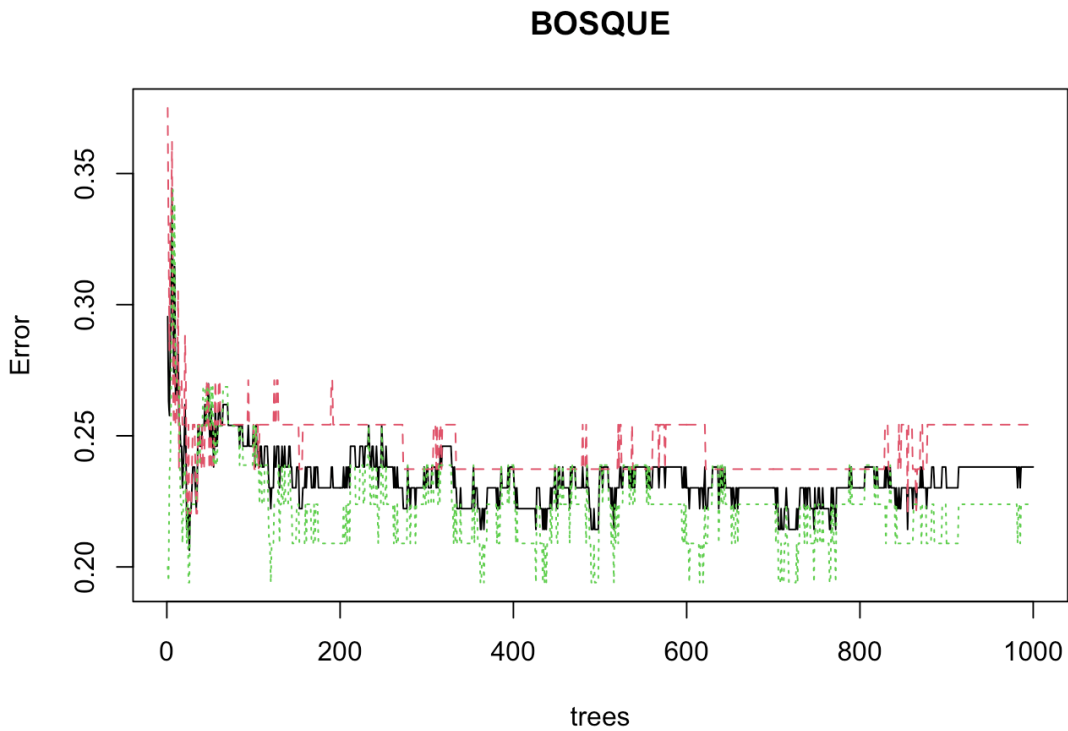


#### 4.2.2.2 Bosque aleatorio metástasis:

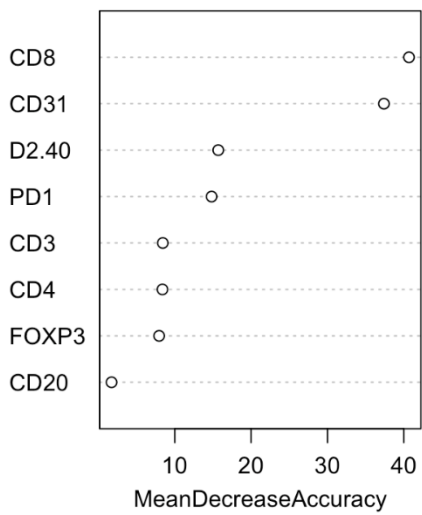
En el bosque aleatorio observamos cómo la “máquina aprende” realizando en este caso un mínimo de 1000 repeticiones, de tal modo que al principio podemos ver una gran dispersión (la máquina “se equivoca” mucho) pero posteriormente va aprendiendo “fallando menos” (tiende a una línea). Los árboles nos hablan de la importancia de cada una de las variables analizadas a la hora de predecir el resultado final (en este caso metástasis o no metástasis). Observamos que utilizando la IHQ de nuestro estudio y analizando todas las variables juntas (análisis multivariante), la que tendría mayor importancia sería  $CD8 > CD31 > D2-40 > PD1 > CD3 > CD4 > FOXP3 > CD20$ .

En el análisis también vemos cuál es la validez de nuestro árbol y bosque para predecir el resultado y que acierta al clasificar a los metastásicos en un 75% y falla en un 25%, y a los no metastásicos acierta en un 78% y falla en un 22%.

Figura 44: Bosque aleatorio metástasis



Importancia de la variable



	MTS	NO MTS	class.error
MTS	44	15	0.25
NO MTS	15	52	0.22

#### 4.2.2.3 Árbol de clasificación incluyendo como variable el índice de Breslow:

Este segundo árbol de clasificación da respuesta a la pregunta ¿si incluimos aparte de los estudios de inmunohistoquímica realizados el índice de Breslow de nuestros melanomas podemos predecir cuáles van a desarrollar metástasis y cuáles no?

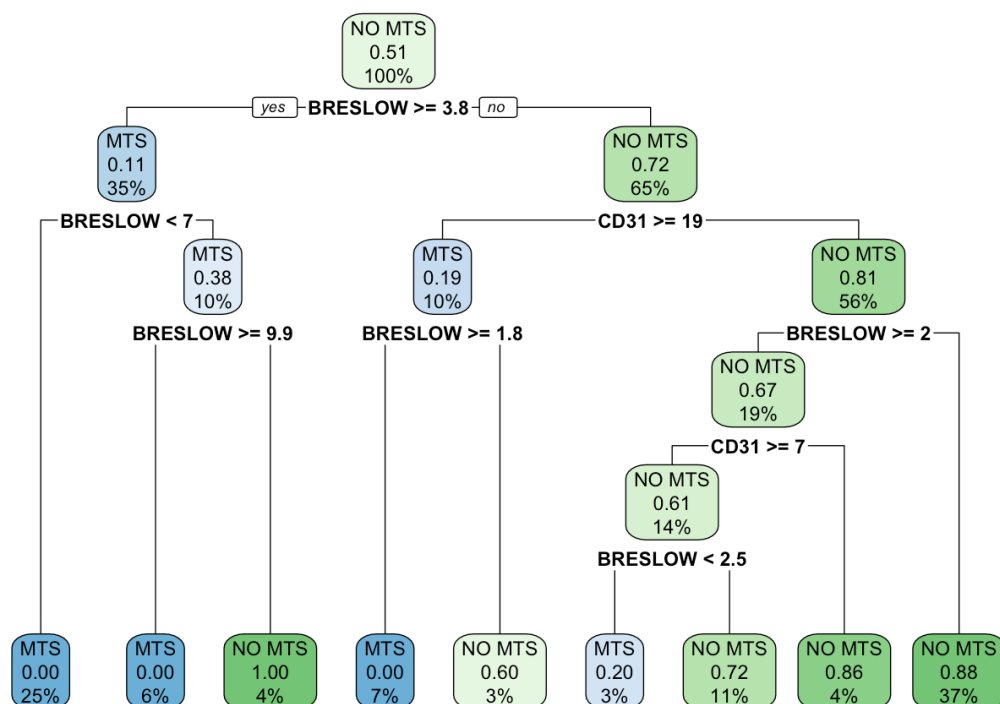
Y obtenemos el siguiente árbol (ver fig.48) en el que por ejemplo:

Si un paciente tiene un índice de Breslow  $< 3,8$  mm, tendríamos que realizar el estudio de los vasos mediante CD 31, si este es mayor o igual a 19 y con un índice de Breslow mayor o igual a 1,8 mm el paciente desarrollará metástasis, mientras que con un índice de Breslow  $< 1,8$  mm no desarrollará metástasis.

En cuanto a la importancia de las variables incluyendo el índice de Breslow vemos que Breslow $>$ CD31 $>$ CD8 $>$ PD1 $>$ CD4 $>$ D2-40 $>$ CD20 $>$ FOXP3.

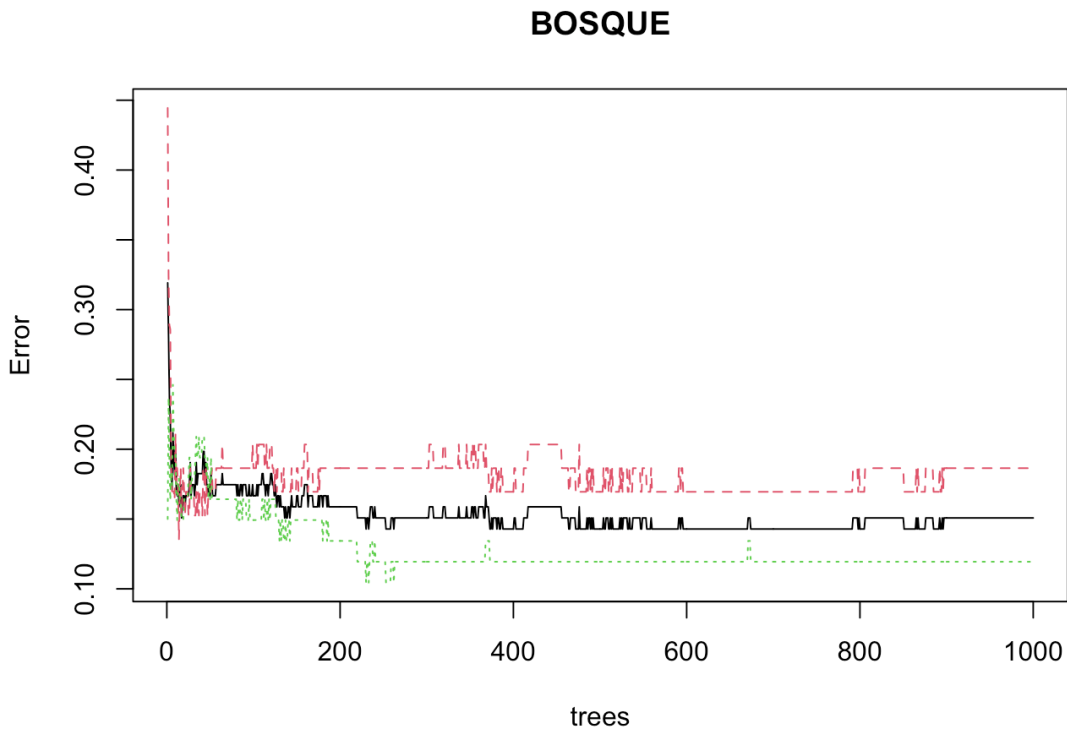
Y observamos que este árbol y bosque clasifica bien al 81% de los metastásicos y falla en un 19% y en el caso de los no metastásicos clasifica bien al 88% y falla en un 12%.

Figura 45: Árbol de clasificación incluyendo como variable el índice de Breslow

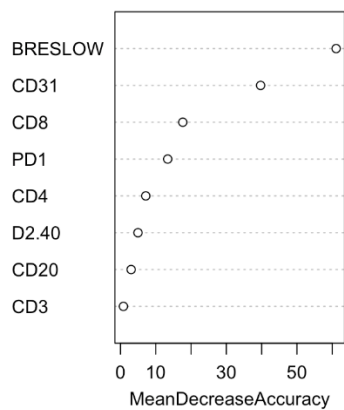


4.2.2.4 Bosque aleatorio incluyendo como variable el índice de Breslow:

Figura 46: Bosque aleatorio incluyendo como variable el índice de Breslow



Importancia de las variables

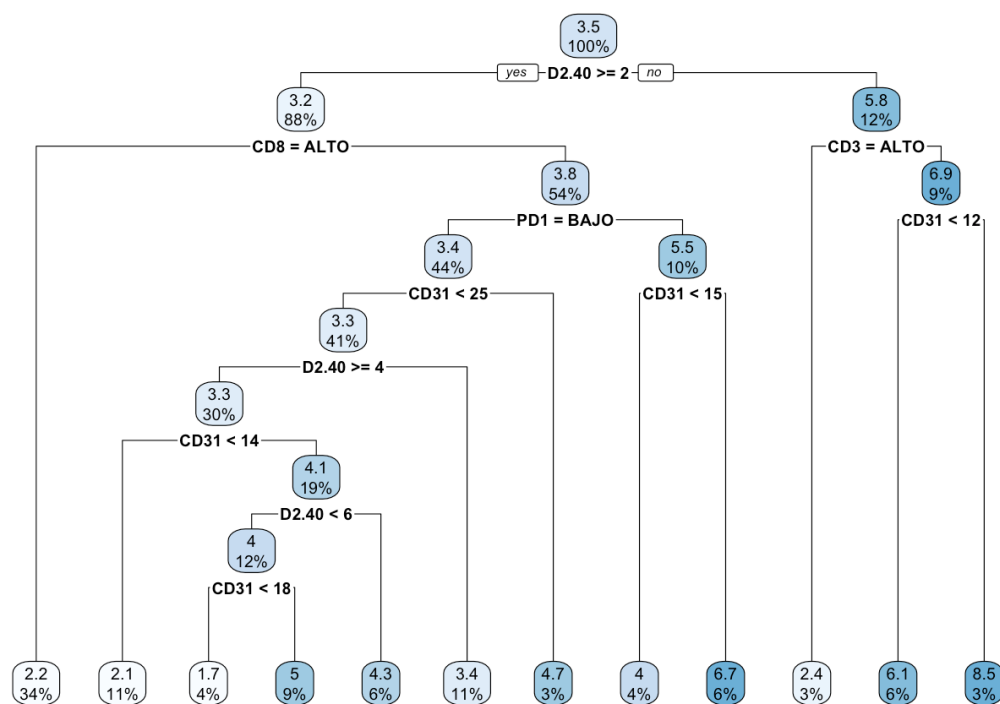


	MTS	NO MTS	class.error
MTS	48	11	0.19
NO MTS	8	59	0.12

#### 4.2.2.5 Árbol de clasificación para predecir el índice de Breslow:

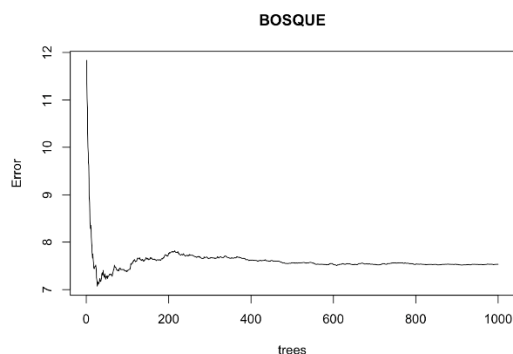
Se pueden realizar árboles de clasificación para todas las variables, pero no en todas es útil, como por ejemplo este árbol y bosque que intenta responder a la pregunta de si en función de los resultados de la inmunohistoquímica podemos predecir el índice de Breslow que van a tener nuestros pacientes. En este caso la máquina no es capaz de aprender y el resultado es NULO.

Figura 47: Árbol de clasificación para predecir el índice de Breslow



#### 4.2.2.6 Bosque de clasificación índice de Breslow:

Figura 48: Bosque de clasificación índice de Breslow



## 5. DISCUSIÓN

## **5.1 Epidemiología:**

### **5.1.1 Sexo:**

En nuestro trabajo recogimos como variable el sexo de nuestros pacientes ya que es un factor pronóstico importante en los pacientes con melanoma y hay diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la incidencia, características del tumor primario y supervivencia.

En nuestra serie incluimos 38 hombres y 43 mujeres en global, pero tenemos que señalar que el sexo no se incluía como criterio de inclusión/ exclusión en el estudio y por tanto la distribución en cuanto a sexos en ambos grupos no estaba pre-especificada.

Independientemente de las diferencias de incidencia en función de los países la supervivencia de las mujeres con melanoma es mejor que la de los hombres en numerosos estudios<sup>136</sup>.

Nosotros observamos un mayor número de pacientes varones en el grupo de melanomas metastásicos en comparación con el grupo de los melanomas no metastásicos con diferencias estadísticamente significativas, lo que va en línea con los estudios previamente publicados.

Está descrito que las mujeres tienen melanomas más finos y mayor frecuencia de melanoma de extensión superficial en comparación con los varones en los que sería más frecuente el subtipo de melanoma nodular y melanomas con mayor espesor tumoral. Sin embargo, estas diferencias en las características de los melanomas primarios no explican del todo las diferencias de supervivencia encontrada entre los sexos. Muchos estudios que utilizan análisis multivariante encuentran que el sexo por sí mismo es un factor independiente predictor de la supervivencia<sup>57</sup>. Hay que señalar que no realizamos un análisis multivariante para estratificar a los pacientes según el sexo y el tipo de melanoma o el grosor (índice de Breslow) de los mismos, por lo que en nuestro estudio no podemos asegurar que las diferencias encontradas entre ambos grupos no se deban a alguno de estos factores.

En un estudio publicado por Mervic y cols<sup>57</sup> analizan 7338 pacientes con melanoma del sureste de Alemania y encuentran que los hombres tienen una supervivencia a los 10 años del 83,9% en comparación con las mujeres en las que es del 89,5% con diferencias estadísticamente significativas. Encuentran que el sexo es un factor independiente de supervivencia en el análisis multivariante y ajustado por otros factores: grosor del tumor (Breslow, presencia de ulceración, nivel de Clark, localización del melanoma, subtipo histopatológico y edad del paciente al diagnóstico)<sup>57</sup>.

En estudios que estratifican la supervivencia en función del sexo en distintas categorías de edad se encuentran resultados contradictorios. Algunos reportan una supervivencia de las mujeres superior en todas las edades <sup>138</sup> mientras que en otros se encuentra que la ventaja de las mujeres se pierde con la edad (pérdida del beneficio a partir de los 65 años) <sup>139</sup> .

Hoy por hoy los mecanismos moleculares que explicarían estas diferencias de supervivencia son desconocidos: Factores hormonales, diferencias en la inmunidad y diferencias en cuanto el estrés oxidativo podrían jugar un papel relevante <sup>140</sup>.

También hay estudios sobre las diferencias genéticas entre hombres y mujeres, como se ha comentado en la introducción se han estudiado polimorfismos en el gen MC1R (gen del receptor de la melanocortina) entre sexos.

En nuestro trabajo no hemos realizado estudio de las mutaciones genéticas de este gen, aunque consideramos que puede ser interesante de cara a futuros trabajos ya que nos permitiría esclarecer conceptos en este sentido.

#### **5.1.2 Edad:**

Otra de las variables clínicas que incluimos en el trabajo fue la media de edad a la que a los pacientes se les realizó el diagnóstico del melanoma primario ya que la edad avanzada se ha relacionado con un incremento en la incidencia de melanoma así como con una mayor mortalidad asociada. Los melanomas en pacientes ancianos tienen peor pronóstico<sup>27</sup>.

En nuestra serie tomada en conjunto la media de edad al diagnóstico fue de 62,55 años, y si valoramos el grupo de melanoma metastásico y no metastásico por separado, vemos que la media de edad en el grupo de los melanomas metastásicos es ligeramente inferior a la de los no metastásicos (61,5 vs 63,6) pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas como se ha señalado en el apartado de resultados.

Por las particularidades a nivel del sistema inmunológico que se encuentra en este subgrupo de población (comentado en la introducción de este trabajo) que se van modificando en función de la edad nos planteamos si las distintas subpoblaciones linfocitarias en el TIL se podrían ver influidas por este factor y realizamos un sub-análisis en este sentido que discutiremos más adelante.

Además en los pacientes de mayor edad, se ha visto que hay una menor frecuencia de afectación del ganglio centinela a pesar de fenotipos más agresivos, esto ha sido corroborado en varias series. En nuestro estudio recogimos el dato de la afectación de ganglio centinela,



como se puede ver en las gráficas, pero no realizamos análisis de positividad /negatividad en función de la edad, ya que en los criterios de inclusión de los melanomas no metastásicos era requisito que se realizara ganglio centinela. Señalar sin embargo que este hecho (la positividad / negatividad en el ganglio centinela) en nuestra serie de melanomas en el hospital está siendo objeto de estudio y pendiente de obtener y analizar los resultados.

La atrofia de los vasos linfáticos cutáneos podría contribuir a una disminución de la respuesta inmunitaria. La función linfática evaluada por el tránsito y captación de radiocoloides dentro del ganglio centinela disminuye con la edad. Todo esto condiciona un predominio de la diseminación hematógena en la edad avanzada.

Estos datos condicionan un aumento de la mortalidad por melanoma y una disminución de la tasa de afectación del ganglio centinela por lo que hay que individualizar las decisiones terapéuticas en este grupo de pacientes.

Aunque en nuestra serie no hemos incluido ningún melanoma en edad pediátrica hay que señalar que en este subgrupo de población la edad de aparición también parece ser un factor importante; en una serie publicada de melanoma en pacientes pediátricos con 33 casos (por lo que los resultados deben valorarse con cautela) los menores de 10 años tienen una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 90% en comparación con el 47% de los mayores de 10 años. Esta diferencia no puede atribuirse al grosor tumoral, por lo que los melanomas en los niños más jóvenes podrían tener un comportamiento biológico distinto al de los adultos <sup>227</sup>.

### **5.1.3 Localización melanoma primario:**

La localización del melanoma es un factor pronóstico independiente en algunas series. Los melanomas del tronco, cabeza y cuello tienen peor pronóstico que los localizados en las extremidades (excluyendo los localizados en manos y pies).

Los primeros (denominados axiales) tienen con mayor frecuencia diseminación a distancia en comparación con los localizados en las extremidades. Por otro lado los melanomas en las extremidades dan metástasis locales con mayor frecuencia que los axiales <sup>144</sup>.

Estudios de áreas más concretas describen que los melanomas localizados en antebrazo y en la zona anterior del brazo tienen mejor pronóstico que los localizados en las manos o en la zona posterior del brazo <sup>228</sup> y que existe un peor pronóstico de los pacientes con melanomas localizados en la zona media e inferior de la espalda y la zona mamaria y supramamaria en comparación con los localizados en la zona superior de la espalda o la zona abdominal <sup>229</sup>.

Las diferencias en el curso clínico entre estas localizaciones se explicaban tradicionalmente por las diferencias en el drenaje linfático. La mayor longitud de los vasos linfáticos en las extremidades así como el mayor número de ganglios linfáticos en su trayecto hasta la circulación sanguínea, podrían ser factores que explicaran el mejor pronóstico de los melanomas localizados en las extremidades <sup>144</sup>.

Los melanomas primarios localizados en sitios de pronóstico desfavorable se han clasificado como *BANS (back, upper arm, neck, scalp)* o *TANS (trunk, upper arm, neck, scalp)* <sup>145</sup> de forma clásica, aunque a raíz de las nuevas clasificaciones genéticas la tendencia es a considerar estas denominaciones como obsoletas y tender a la clasificación en función de las mutaciones que presentan los melanomas, que a su vez se relacionan con el tipo de exposición solar a la que se ha sometido determinada localización anatómica. Así según los datos del proyecto del atlas genético del cáncer encontraron que los pacientes con melanoma podían clasificarse en 4 tipos genéticos: pacientes con mutaciones en BRAF, pacientes con mutaciones en NRAS, pacientes con mutaciones en el gen NF-1, y pacientes en los que no se encuentra ninguna de las anteriores mutaciones (*triple wild Type*) <sup>47</sup>.

En nuestro trabajo no hemos realizado el análisis genético de todos los melanomas (aunque consideramos que idealmente todos los melanomas que diagnosticamos deberían tener realizado este estudio) y evaluamos el dato de localización clásica según localización en BANS o no BANS, entre otras cosas porque, al tratarse de un estudio retrospectivo es el dato del que disponíamos en las historias clínicas de nuestros pacientes.

Curiosamente en nuestra serie observamos un mayor número de pacientes con melanomas localizadas en áreas catalogadas como BANS en el grupo de los no metastásicos (25/41) que en el grupo de los melanomas metastásicos (16/40), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas  $p=0,096$ . Este dato puede deberse al azar debido a que el tamaño muestral no es muy grande o puede deberse en realidad a que la localización clasificada como BANS no es representativa en el momento actual de la exposición solar/hábitos de nuestros pacientes y no incluye manos y pies, bien porque hacen más revisiones periódicas en las que se examinan esas localizaciones, bien debido a mutaciones genéticas diferenciales o por otros motivos aún desconocidos.

## **5.2. Factores histopatológicos del melanoma primario:**

### **5.2.1 Tipo de melanoma primario:**

Como hemos comentado en la introducción desde hace más de 40 años se describen 4 subtipos clásicos de melanoma: melanoma extensión superficial (MES), melanoma nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LMM) y melanoma lentiginoso acral (MLA).

Se ha descrito una mejor evolución del lentigo maligno melanoma y un peor pronóstico de los melanomas lentiginosos acrales independientemente de su grosor, asimismo como hemos comentado anteriormente en los pacientes de edad avanzada se observa con mayor frecuencia melanomas nodulares que, a diferencia del melanoma de extensión superficial o del lentigo maligno melanoma, no se relaciona con los signos y síntomas precoces que nos permiten reconocerlo <sup>230</sup>. Sin embargo en general, el subtipo histológico tiene poco valor pronóstico actualmente, ya que como señalan varios autores son muchos los casos en los que se observa un solapamiento de los hallazgos histopatológicos clásicos y además no tiene utilidad pronóstica mas allá de la que se produce por la propia localización del melanoma y por ende de las mutaciones genéticas que se encuentran en los mismos <sup>231</sup>.

Por estos motivos, y es algo a lo que ya estamos asistiendo, lo lógico es que acaben estableciéndose clasificaciones del melanoma a partir de sus alteraciones moleculares con mayor trascendencia pronóstica y terapéutica.

En nuestro trabajo sí hemos analizamos el tipo de melanoma en función de los subtipos clásicos al ser la información de la que disponíamos y sí hemos observamos que en el grupo de los melanomas no metastásicos había mayor número de pacientes con las variantes de lentigo maligno melanoma y melanoma de extensión superficial con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de los melanomas metastásicos; mientras que en el grupo de los melanomas metastásicos había un mayor número de pacientes con melanoma nodular con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,05$ ). Encontramos mayor número de melanomas acrales en el grupo de los metastásicos pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Existen otras variantes menos frecuentes de melanoma como el melanoma desmoplásico que está constituido por células fusiformes incluidas en un estroma fibrótico. Hay estudios que describen dos variantes de este, la variante pura cuando la lesión es desmoplásica al 100% y combinada cuando existen en la misma lesión áreas en la que se observan estructuras de melanoma convencional <sup>232</sup>. El melanoma desmoplásico suele iniciarse con un grosor tres

veces superior a la de otros tipos de melanoma, actualmente se considera que los melanomas desmoplásicos puros tienen un mejor pronóstico que la variante combinada <sup>233</sup>.

La implicación de la presencia de este tipo histológico de melanoma en la supervivencia global de los pacientes es contradictoria, hay estudios en los que se señala que los pacientes con melanomas desmoplásicos tienen una supervivencia mayor que los melanomas convencionales con un grosor equiparable mientras que en otros se describe que la supervivencia es similar cuando se ajusta por grosor tumoral <sup>234</sup>.

Existen otras variantes infrecuentes de melanomas como los nevoides, los spitzoides los melanomas angiotropos o el nevus azul melanoma, pero su baja frecuencia impide conocer su impacto pronóstico.

En nuestra serie de los 81 melanomas que incluimos en el estudio, encontramos 4 casos que no se englobaban en los subtipos histológicos clásicos de melanoma, los 4 se trataban de melanomas metastásicos y las variantes fueron 1 melanoma epitelioides, 2 melanomas spitzoides y un melanoma nevoide y, como en los artículos previamente publicados dado la baja frecuencia de los mismos el análisis no presenta datos con diferencias estadísticamente significativas. No tuvimos en nuestra serie ningún caso de nevus azul melanoma, melanoma desmoplásico, melanoma angiotropo o melanoma tipo animal. En el seguimiento de estos pacientes el paciente con el melanoma epitelioides y uno de los spitzoides fallecieron a causa de los mismos y los otros 2 pacientes se encuentran vivos con enfermedad y en tratamiento por oncología.

### **5.2.2 Grosor tumoral:**

Como hemos comentado en la introducción, la determinación del grosor tumoral fue introducida por primera vez por Breslow en 1970 y se define como la distancia desde la parte superior de la capa granulosa del melanoma hasta la célula tumoral ubicada de forma más profunda medida en milímetros <sup>53</sup>. El espesor tumoral se ha reconocido como el factor pronóstico más importante para el melanoma primario invasivo.

En nuestro trabajo, por las características del mismo, sólo se incluyeron melanomas con índice de Breslow >1 mm, encontrando una media de índice de Breslow de 3,6 mm. Si observamos ambos grupos por separado vemos que la media de índice de Breslow, en el grupo de los metastásicos fue mayor que en el grupo de los no metastásicos (5 mm vs 2,2 mm con diferencias estadísticamente significativas), lo que está acorde con lo descrito en la literatura según el cual a mayor grosor del melanoma peor pronóstico.

Llama la atención el alto índice de Breslow que encontramos en nuestros pacientes con melanoma metastásico (5 mm de media) hecho que nos hace reflexionar acerca de la importancia de la detección precoz en estos pacientes (en este caso no ha funcionado en nuestros pacientes) y en pensar en maneras de mejorar la educación para la salud.

### **5.2.3 Regresión histológica:**

Definimos la regresión histológica como una disminución o desaparición de una porción dérmica del melanoma que es sustituido por fibrosis, apareciendo linfocitos, melanófagos y vasos neoformados que se disponen perpendiculares a la epidermis.

En nuestro trabajo encontramos regresión histológica >50% en 35/81 casos (43%), son tasas superiores a las descritas en la bibliografía, pero hay que tener en cuenta que en el trabajo sólo se incluyeron melanomas gruesos (>1 mm Breslow) y que se tomó como corte una regresión superior al 50% y no del 75%. Si nos fijamos en los 2 grupos de metastásicos y no metastásico, hay una mayor frecuencia de regresión en el grupo de los no metastásicos (51,2%) en comparación con el grupo de los metastásicos (35%) de los pacientes. Estos datos van en la línea de considerar la regresión histológica como un factor protector (acorde a los trabajos más recientes a este respecto), aunque las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

En las distintas series está presente en un 10-35% de los casos, y es entre los factores pronósticos clásicos, el que presenta mayor falta de consenso, tanto en su descripción como en su utilidad pronóstica <sup>235</sup>.

Clásicamente la presencia de regresión se ha considerado un factor de mal pronóstico, sobre todo en los melanomas finos (<1mm Breslow) en los que se objetivaba una extensión de la regresión superior al 75% del tumor <sup>236</sup>. En un estudio de más de 9500 pacientes, la presencia de regresión >75% estaba presente en todos los melanomas finos (<0.8 mm de Breslow) que presentaban metástasis linfáticas regionales <sup>237</sup>.

Se ha considerado en otros trabajos también como mal pronóstico cuando existe una regresión >50% <sup>238</sup>. Sin embargo hay otros autores en los que apuntan en la dirección opuesta, así en el artículo de Zugna y cols de 2018 <sup>239</sup> incluyen 365 pacientes con melanoma a los que se les realizó ganglio centinela y fue positivo y estudiaron la asociación entre la regresión histológica en el melanoma primario y la supervivencia y encontraron que la regresión histológica, presente en 43 de sus pacientes, se relacionaba con un mejor pronóstico, por lo

que concluyen que el encontrar este factor histológico puede mejorar la previsión pronóstica en los pacientes con melanoma y ganglio centinela positivo.

En la revisión sistemática y meta-análisis publicada en 2017 en la *Br J Dermatol* sobre este aspecto <sup>240</sup> se revisaron 183 artículos para incluir finalmente 10 estudios en el análisis con 8557 pacientes. Encontraron que los pacientes con regresión histológica tenían un riesgo relativo de muerte inferior a aquellos que no la tenían, por lo que concluyen que la presencia de regresión histológica es un factor protector de supervivencia.

#### **5.2.4 Nevus previo asociado:**

Según las series, la presencia de un nevus previo en el estudio de un melanoma se presenta en aproximadamente un 25% de los pacientes <sup>241</sup>, aunque en algunas series más recientes la incidencia es de un 17,5% <sup>242</sup>.

Es cierto que es importante ver en qué poblaciones se realiza, ya que por ejemplo en la población asiática la frecuencia de nevus melanocitos adquiridos es menor que en población europea <sup>243</sup>.

En nuestra serie encontramos evidencia de un nevus previo en 11/81 pacientes una incidencia de un 13,18% inferior a la descrita en otros trabajos. Esto puede ser debido a la selección de los pacientes, ya que al ser todos los casos seleccionados pacientes con melanomas gruesos es posible que en caso de existir nevus previo éste haya sido “eliminado” por el melanoma.

Considerando los 2 grupos de manera separada hay 8 de ellos en el grupo de los melanomas metastásicos y 3 en el grupo de los no metastásicos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas  $p=0,180$ . Estos resultados son contrarios a los encontrados en el estudio de 2005 de Hembold P y cols <sup>244</sup> en el que señalaban que la presencia de nevus previo se relacionaba con una menor proporción de metástasis o el de Shen YS y cols <sup>242</sup> cuyos resultados van en la misma dirección. Hay otros estudios como el de Jhonson N y cols <sup>245</sup> y el de Kaddu S y cols <sup>246</sup> en los que no han podido demostrar dicha asociación.

En lo que sí hay más consenso es en el hecho de que una historia previa de melanoma sobre nevus aporta 9 veces más riesgo para un segundo melanoma sobre nevus en estos pacientes

<sup>247</sup>.

### 5.2.5 Infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL):

Como se ha comentado en la introducción en 1.5.1.5.9 el infiltrado inflamatorio asociado al tumor se observa con mucha frecuencia en el cáncer como método del propio organismo para luchar contra el mismo.

Asimismo se considera que la composición de este TIL tiene también una repercusión importante en lo que se refiere al pronóstico y evolución de los tumores, ya que los distintos subtipos de linfocitos tienen distintas funciones a lo que al microambiente tumoral se refiere, por lo que es importante los estudios del mismo. Es en este aspecto donde nos hemos centrado en nuestro estudio evaluando mediante IHQ los distintos componentes del infiltrado inflamatorio asociado al tumor.

En nuestra serie, del global de los 81 pacientes un 17 (20,98%) se catalogó como ausente, 35 (43,20%) como intenso y en 29 (35,8%) como no intenso. La disparidad con las cifras publicadas puede deberse a varios factores como: el escaso número de pacientes en nuestra serie, los melanomas estudiados en cada uno de los estudios ( en la serie de Weiss y cols <sup>103</sup> incluyen todos los melanomas primarios (finos y gruesos) mientras que en nuestra serie todos los pacientes tenían melanomas gruesos, la variabilidad interpersonal e intrapersonal a la hora de evaluar el TIL y catalogarlo ( lo cual podría reducirse mediante la utilización de métodos automatizados o la inteligencia artificial). En nuestro estudio, la evaluación de los TIL ha sido realizada por dos dermatopatólogos expertos y realizamos 2 TIL de cada una de las muestras de melanoma para reducir esta variabilidad, aunque no se realizaron evaluaciones repetidas por cada uno de los evaluadores.

Al evaluar por separado el grupo de los melanomas metastásicos y no metastásicos, vemos que en el grupo de los metastásicos hay mayor número de pacientes que presentan un TIL catalogado como ausente o no enérgico en comparación con el grupo de los no metastásicos, mientras que en el grupo de los no metastásicos hay un mayor número de pacientes con TIL catalogado como enérgico, lo que va en la línea de que un TIL enérgico aporta un mejor pronóstico a los pacientes, aunque en nuestro estudio no lo relacionamos con supervivencia global, ni supervivencia libre de melanoma ni se analizó el TIL en el estudio multivariante.

Los ya citados Weiss y cols <sup>103</sup> no encuentran que las tinciones con IHQ mejoren la predicción pronóstica en comparación con la tinción exclusivamente con H-E. Nosotros, sin embargo, consideramos que la IHQ sí es de utilidad para definir el pronóstico de nuestros pacientes, sobre todo si utilizamos herramientas como el *learning machine*, como discutiremos más adelante.

También realizaron estudio de 594 genes inmunoreguladores en 67 melanomas primarios y vieron que los melanomas con infiltrado ausente o no intenso tenían una expresión similar de genes inmunoreguladores mientras que en los catalogados como enérgicos se demostró un regulación al alza de la activación de las células T y una inhibición de los reguladores “*checkpoint*”. Ellos concluyen que los melanomas con un infiltrado inflamatorio intenso tienen un mejor pronóstico que los TIL ausente o no intenso.

#### **5.2.6 Invasión vascular:**

Se define la invasión vascular cuando se observan células del melanoma en la luz vascular, y este es el criterio que se ha seguido en nuestro trabajo, valorado como una variable dicotómica (sí/no). La presencia de invasión vascular es un factor independiente de mal pronóstico <sup>248</sup>.

En el estudio de Tas F y Ertuck K <sup>249</sup> estudian de forma retrospectiva la invasión linfovascular (ILV) en 705 pacientes con melanoma, 624 de ellos (88,5%) no tenían invasión linfovascular y 81 sí que la presentaban (11,5%). Señalan también que los pacientes que tenían ILV tenían con más frecuencia un melanoma nodular, mayor índice de Breslow, mayor ulceración, mayor tasa mitótica, mayor neurotropismo, mayor afectación ganglionar, enfermedad recurrente y metástasis a distancia con diferencias estadísticamente significativas, en comparación con aquellos que no la presentaban.

En nuestra investigación la frecuencia de invasión vascular ha sido menor que la descrita en la bibliografía un 4,93% de los casos estudiados. Separando los grupos, vemos una frecuencia de ILV de 7,5% de los casos en comparación con un 2,4% en el grupo de los no metastásicos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,59$ ).

El hecho de encontrar ILV es infrecuente para melanomas finos ( $<1,5$  mm), la frecuencia aumenta con el grosor <sup>248</sup>.

Existe también en la literatura el concepto de “invasión vascular incierta” que se define cuando se ven células del tumor al lado del endotelio vascular pero no invadiendo la luz, el pronóstico de los pacientes en los cuales se encuentra este tipo de invasión vascular es similar al de aquellos pacientes en los cuales se ve una invasión vascular cierta, aunque este es un hecho que no hemos valorado en nuestra serie.



Otro concepto que últimamente está de moda y cada vez toma más relevancia es el de “angiotropismo” que se entiende como el hecho de que las células del melanoma puedan migrar a través de la superficie externa de los vasos sanguíneos.

La habilidad de las células del melanoma para extenderse por fuera de la superficie de los vasos fue descrito por Handley en 1907 <sup>250</sup>. Aunque él pensaba que era por la proximidad de los vasos sanguíneos y decía que las células eran atraídas a esa localización por algún tipo de “quimiotaxis”, posteriormente Lugassy y Barnhill <sup>251</sup> describieron la migración de las células del melanoma por la parte exterior de los vasos sanguíneos en un mecanismo denominado “migración extravascular de las metástasis”. Este hecho se ve fundamentalmente en los vasos pequeños de los extremos del melanoma y se considera como un nuevo mecanismo de metastatización extravascular. Para estudiar el angiotropismo se ha utilizado la IHQ con S100 y CD31, aunque dichas técnicas no han supuesto un incremento de sensibilidad sobre la detección con H-E. Lugassy y cols utilizaron doble IHQ con Melan A y CD31 para resaltar los vasos en el melanoma aunque no lo utilizaron para relacionarlo con el pronóstico <sup>252</sup>. Posteriormente sí que se ha publicado que el angiotropismo se relaciona con mayor frecuencia con recidivas locales y metástasis en tránsito <sup>253</sup>.

En nuestro estudio no hemos valorado el angiotropismo, aunque consideramos que puede ser una línea interesante de investigación para futuros trabajos. Intentar relacionar/ conocer la relación entre la diseminación intravascular y extravascular del melanoma podría ayudarnos a valorar/ predecir cuales de nuestros pacientes tiene riesgo de desarrollar metástasis.

### **5.2.7 Neurotropismo:**

Entendemos por neurotropismo la infiltración por las células del melanoma de las fibras nerviosas con la subsecuente extensión del tumor por las mismas. En nuestro estudio lo valoramos como una variable dicotómica según este criterio (si/no).

La presencia de neurotropismo está descrita con mucha mayor frecuencia en los melanomas desmoplásicos y define al melanoma desmoplásico neurotropa <sup>254</sup>.

De las series recientes publicadas destacan la de Tas F y Ertuk K los cuales estudian un total de 519 melanomas, ellos encontraron la presencia de neurotropismo en 23 pacientes (4,4%) y su ausencia en 496 (95,6%). La presencia de neurotropismo la encontraron con más frecuencia en melanomas localizados en extremidades, en melanomas de extensión superficial, nivel de Clark IV y V, índice de Breslow > 1 mm, alta tasa mitótica, lesiones ulceradas, invasión

linfovascular y metástasis linfáticas con diferencias estadísticamente significativas cuando se realizó análisis univariante, sin embargo perdía la significación pronóstica cuando se realizaba un análisis multivariante, por lo que concluyen que es un factor que debe considerarse asociado a otros factores <sup>255</sup>.

En la de Varey AHR y cols <sup>256</sup> se estudia una cohorte de 671 pacientes con melanoma con neurotropismo, diagnosticado en el instituto del melanoma de Australia entre 1985 y 2013 y ellos si encuentran en el análisis multivariante que la presencia de neurotropismo se relacionaba con una menor supervivencia específica por melanoma, aunque no con la recurrencia local. Además, señalaban que en los pacientes con melanoma y presencia de neurotropismo es importante la escisión con márgenes adecuados y en caso de no realizarse una extirpación con márgenes suficientes la radioterapia adyuvante reduciría el riesgo de recurrencia.

Y por último Gamsizkan M y cols <sup>257</sup> estudiaron de manera retrospectiva 1574 pacientes con melanoma de 18 hospitales en Turquía y encontraron que tanto el TIL como el neurotropismo (presente en el 18,4% de sus casos) no se relacionaban con la frecuencia de afectación de ganglio centinela ni la supervivencia.

En nuestro estudio la frecuencia en el global de la serie de invasión perineural ha sido de un 7,4%, lo que está entre las frecuencias descritas en la bibliografía (4,4%-18,4%). Si nos fijamos en el grupo de los metastásicos en comparación con el de los no metastásicos encontramos una frecuencia de un 12,5% vs un 2,5%, una diferencia llamativa aunque sin alcanzar la significación estadística posiblemente por el número de pacientes.

### **5.3 Poblaciones linfocitarias:**

En esta tesis nos centramos no sólo en la evaluación del infiltrado inflamatorio asociado al tumor sino en caracterizar y analizar los distintos componentes que lo integran con el objetivo de valorar si había diferencias en el grupo de los melanomas metastásicos y no metastásicos en nuestra serie de pacientes. Se ha descrito un pronóstico distinto en función de los mismos y también se ha publicado recientemente que dependiendo del tipo de infiltrado inflamatorio que exista se va responder mejor a la inmunoterapia. Así Wong PF y cols <sup>258</sup> estudian el TIL (CD4, CD8, CD20, CD3, GZMB, Ki67) en 94 pacientes con melanoma previamente a ser tratados con fármacos anti PD 1 y en los resultados encuentran que un mayor infiltrado linfocitario valorado por CD3 era mayor en los pacientes que presentaban una respuesta completa o

parcial en comparación con aquellos pacientes en los cuales progresaba el melanoma. Este dato era más llamativo con la valoración de CD8 positivo, por lo que los autores concluyen que el TIL previo al tratamiento se relaciona con la respuesta a anti PD1.

### **5.3.1 Expresión CD3:**

De forma similar a los estudios en los que se ha descrito un efecto protector del infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL), las células CD3 positivas se han relacionado con una mejoría en la supervivencia del cáncer <sup>259</sup>.

Aunque en algunos estudios se ha estudiado el complejo CD3-TCR (receptor de células T CD3), generalmente se usa el CD3 como un marcador Pan-T <sup>260</sup>.

En el meta- análisis publicado en abril de 2019 por Fu y cols <sup>261</sup> sobre melanoma en el que analizan los estudios en los cuales se han evaluado los linfocitos CD3 + en el TIL, incluyen 7 de los 8 artículos publicados hasta ese momento, (el excluido lo fue por no disponer en el mismo de una curva de supervivencia y un intervalo de confianza del 95%). En este meta-análisis encuentran que la presencia de linfocitos CD3+ se relaciona con un mejor pronóstico en pacientes con melanoma no especificado (melanoma NOS: no especificado la localización). Resultados similares encuentran Wong PF y cols <sup>258</sup> los cuales además de relacionar el infiltrado con CD3 con un mejor pronóstico lo relacionan con una mejor respuesta a la inmunoterapia que se utiliza actualmente, en concreto con la respuesta a los anti PD1.

El mecanismo exacto por el cual el TIL CD3+ podría ser un factor de buen pronóstico no se conoce todavía y podría estar en relación con la regulación de la señalización celular.

Ya anteriormente se habían publicado estudios con un número importante de pacientes y bien diseñados como el anteriormente comentado de Weiss SA y cols <sup>103</sup> con 1241 melanomas cutáneos primarios encontrando que los CD3 totales eran útiles para la detección del infiltrado inflamatorio asociado al tumor pero no específico del grado de TIL y señalan que la detección mediante IHQ del mismo no tiene un impacto en la supervivencia cuando lo comparan con la detección y gradación del TIL mediante hematoxilina –eosina y que no aportaría nada su detección mediante este método.

En nuestro estudio se ha cuantificado el porcentaje de células CD3 de forma semi-cuantitativa de la manera expresada en material y métodos aunque en el análisis estadístico se agregó expresión catalogada como 0 y 1 como baja y expresión catalogada como 2 y 3 como alta expresión. En nuestra serie no conseguimos encontrar diferencias estadísticamente

significativas entre el grupo de los metastásicos y no metastásicos, es posible que fuera por el número de pacientes incluidos en el estudio. Aun así consideramos que existen otros marcadores IHQ que nos pueden orientar mejor sobre el pronóstico de nuestros pacientes como discutiremos a continuación.

### 5.3.2 Expresión CD4 y FOXP3:

Los linfocitos Th CD4 *helper* suponen un grupo heterogéneo, los Th1 tienen un papel importante activando a los linfocitos citotóxicos, mientras que las Th2 tienen un papel importante estimulando la inmunidad humoral y activando los eosinófilos. En términos de capacidad antitumoral una activación Th2 es menos efectiva que una activación Th1 <sup>262</sup>.

Además de los linfocitos Th1 y Th2, otro tipo de linfocitos T CD 4+, denominados reguladores (Treg) tienen un efecto supresor sobre los linfocitos T efectores <sup>263</sup>.

En nuestro estudio hemos utilizado FOXP3 como marcador de LT reg, ya que se considera el marcador más específico para los mismos <sup>264</sup>, aunque hay que mencionar que no es un marcador patognomónico ya que se ha descrito que hay otras poblaciones de LT que también pueden expresarlo <sup>265</sup>. Por lo tanto no se puede excluir que algunas de las células activadas LT que expresan FOXP3 no sean Treg aunque como se espera que la frecuencia de LT no reguladores que expresan FOXP3 sea muy baja, se utiliza FOXP3 como marcador de los mismos. Por otro lado, en la literatura revisada no se ha encontrado ninguna evidencia de que FOXP3 pueda ser expresado por las propias células del melanoma.

En cuanto a los trabajos realizados en melanoma estudiando los distintos subtipos de linfocitos T, cabe destacar por el mayor número de pacientes estudiados, el de Kluger Hm y cols <sup>266</sup> donde observan en su serie de pacientes con melanoma metastásico que la mayoría de ellos presentaban tanto linfocitos T CD4 como CD8, y sólo en una minoría de los mismos se encontraban exclusivamente linfocitos CD4+, y describen que en su serie el 70% de los pacientes tenía un TIL “enérgico” presentan ambos CD4 y CD8.

En el meta-análisis mencionado anteriormente de Fu Q y cols <sup>261</sup> encontraron que una presencia alta de TIL CD4+ se correlaciona con un mejor pronóstico de forma estadísticamente significativa en el melanoma de sitio no especificado (melanoma NOS).

Como se ha señalado anteriormente el papel de los linfocitos TCD4 + está recibiendo mucha atención en los últimos tiempos, estos linfocitos tienen un papel muy importante en la iniciación de los LTCs, así como en la formación y mantenimiento de los CD8 memoria. En los

tumores los LTCs pueden ser activados por varios mecanismos que mantienen e incrementan la respuesta antitumoral <sup>267,268</sup>.

En nuestro trabajo sí hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD4 entre los melanomas metastásicos y los no metastásicos ( $p < 0,001$ ), de tal manera que en un mayor porcentaje de casos la expresión de este fue catalogada como alta en el grupo de los no metastásicos, acorde a las evidencias científicas actuales. Es por lo tanto un marcador IHQ que en el caso de obtener una alta expresión podría ayudarnos a predecir un mejor pronóstico de nuestros pacientes.

La expresión de FOXP3 se ha correlacionado con peor pronóstico en distintos tipos de tumores como el de mama y el adenocarcinoma gastrointestinal <sup>269</sup>, sin embargo su expresión se ha relacionado con mejor pronóstico en otros tumores como el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello <sup>270</sup>.

En el caso del melanoma existe mayor controversia ya que hay estudios que lo relacionan con mejor pronóstico y otros que lo relacionan con peor pronóstico <sup>271</sup>.

Entre los estudios que destacan por señalar que una alta expresión de FOXP3 en el melanoma primario está asociado a progresión tumoral está el de Gerber A.L y cols <sup>272</sup> en el cual incluyen 158 melanomas primarios y mediante IHQ la expresión de FOXP3, ellos encuentran que el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global total es superior en los pacientes con bajos niveles de FOXP3 en el melanoma primario y señalan que es un factor pronóstico independiente del grosor tumoral evaluado mediante el índice de Breslow y además señalan que podría utilizarse como marcador en los melanomas primarios para predecir la progresión tumoral y el pronóstico.

Como ellos señalan en los tumores malignos se ha demostrado que “crean “un microambiente tumoral inmunosupresor con el objetivo de escapar al sistema inmunológico y promover el desarrollo tumoral.

Además se ha publicado que un número elevado de LT reg circulantes se asocian con una rápida progresión tumoral en modelos experimentales de melanoma en ratones <sup>273</sup>. La actividad reguladora en modelo animal de ratón de células LT CD4+, FOXP3+ sobre distintas células del sistema inmune incluyendo las células NK está bien documentado. Bajo determinadas circunstancias los linfocitos T reguladores en sangre periférica son capaces de adquirir funciones inhibitorias sobre otras células T, sin embargo el papel que ejercen sobre el sistema inmune innato está poco definido.

En el modelo de Wang X y cols <sup>274</sup> encuentran que estos T reg tienen potencial supresor sobre las células NK y citotoxicidad *in vitro* y de este modo facilitan el desarrollo de metástasis. La supresión de las células NK por estos Treg FOXP3 se produce mediante contacto directo célula –célula y es mediado por Qa1:NKG2A. Señalan también que sus hallazgos indican que la respuesta inmune innata frente al tumor se encuentra regulada por la activación del sistema inmune adaptativo, en un fenómeno descrito como “la activación- induce inhibición” y que por lo tanto esta interacción entre los T reg y las células NK debe ser tomada en consideración para futuros tratamientos del melanoma.

También se ha publicado que en los pacientes con melanoma, la presencia de células FOXP3 positivas se ha relacionado con un incremento en la frecuencia de metástasis en ganglio linfático <sup>275</sup>.

Sin embargo en el análisis que hacen de los linfocitos T reg ( FOXP3+) en el meta-análisis de Fu Q y cols <sup>261</sup> se incluyeron 9 estudios y los resultados indicaron un mejor pronóstico en los pacientes con melanoma con un elevado infiltrado con alta positividad para FOXP3.

Para explicar estas discordancias en cuanto al papel pronóstico de FOXP3 hay varias explicaciones, por un lado los LTreg suprimen la respuesta inflamatoria y alteran el metabolismo que está asociado con la progresión tumoral ya que secretan citoquinas antiinflamatorias como IL 10, IL 35 y el factor de crecimiento transformante B ( TGFB) <sup>276</sup>. Otra posible explicación es que los LT FOXP3 positivos solamente son reflejo de los LT reg y que realmente lo que hay que valorar es la ratio de estos LTreg en comparación con otras poblaciones de linfocitos T como el cociente CD8/ FOXP3; sin embargo solamente hemos encontrado un trabajo en el que se analiza esta ratio <sup>277</sup>.

Como limitaciones de este meta – análisis <sup>261</sup> los autores señalan que en el análisis solo se incluyeron artículos publicados en inglés, mientras que estudios realizados en otros idiomas no se incluyeron y por lo tanto artículos relevantes podrían haber quedado excluidos y sobre todo la heterogeneidad de los grupos incluidos en el mismo, ya que aunque la mayoría de los estudios estaban realizados sobre pacientes con melanoma cutáneo, no se encontraba información sobre melanomas uveales o mucosos. Además el valor pronóstico de los marcadores puede ser diferente en función de los distintos estadios tumorales.

Otra limitación la supone el hecho de la variedad de métodos utilizados a la hora de los distintos *scores* y los distintos puntos de corte para los diferentes biomarcadores, ya que no existe consenso sobre los mismos.

En nuestro estudio observamos que en la mayor parte de los pacientes tenemos una expresión de FOXP3 catalogada como baja (tanto en el grupo de los metastásicos como en el de los no metastásicos), y de hecho al separar los dos grupos vemos una expresión de FOXP3 alta en 12 pacientes (15,2%) en comparación con 5 (6,2%) en el grupo de los no metastásicos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas  $p=0,117$ . Estos resultados estarían en la línea de que la expresión de FOXP3 se asociaría a una progresión tumoral y en contra del meta análisis publicado recientemente es posible que este hecho pueda ser debido a que en nuestro estudio incluimos paciente con melanomas gruesos y consideramos que sería interesante realizar un estudio más amplio, con mayor número de pacientes e incluyendo también melanomas finos.

### **5.3.3 Expresión CD8:**

En cuanto al estudio de los linfocitos CD8, se sabe que son citotóxicos y son capaces de matar directamente las células tumorales, se les denomina efectores. Se ha encontrado en distintos tumores como el componente fundamental del infiltrado inflamatorio tumoral y en general se relacionan con un mejor pronóstico <sup>278,279</sup>.

En las series publicadas por Kim MT y cols <sup>280</sup> y Fridman WH y cols <sup>281</sup> encuentran que la presencia de CD 8 pero no la de CD4 se asocia de manera estadísticamente significativa con la supervivencia. Señalan que esto tiene sentido ya que es conocido el papel de memoria y efector de las células CD8 en respuesta a distintas citoquinas inflamatorias y su papel en la prevención de la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis.

Estudios recientes señalan que la presencia de linfocitos CD 8 peritumorales son los que mejor predicen la respuesta a los fármacos anti PD1 <sup>101</sup>.

En el meta análisis de Fu Q y cols <sup>261</sup> en cuanto a los linfocitos T CD8+, se incluyeron 7 estudios que cumplían con los estándares de calidad, en dos de los cuales se encuentra un mejor pronóstico de los linfocitos CD8+ de forma estadísticamente significativa en melanoma de sitio no especificado pero no para el melanoma uveal.

En nuestro estudio en la expresión de CD8 es donde encontramos las diferencias más acusadas entre el grupo de los metastásicos (expresión catalogada como baja en un 85%) y el de los no metastásicos (expresión catalogada como alta en un 57% de los casos). Las diferencias pueden verse en el apartado de resultados tanto en las tablas como en las gráficas, los resultados son acordes a lo publicado hasta el momento actual y nos hace posicionar este marcador IHQ como uno de los principales a la hora de predecir el pronóstico en nuestros pacientes con

melanoma, de tal manera que tener una expresión catalogada como alta nos orientaría a un mejor pronóstico que tenerla baja (en un análisis univariante).

#### **5.3.4 Limitaciones en el estudio mediante inmunohistoquímica de CD4 y CD8:**

Tenemos que tener en cuenta que los estudios de las subpoblaciones de linfocitos son cada vez más extensos y exhaustivos. De hecho como publican Parrot T y cols <sup>282</sup> existen linfocitos T que son CD 4 y CD 8 positivos, lo que se denomina LT doble positivos (DP).

En estudios previos de este grupo encuentran que este tipo de linfocitos DP en el infiltrado inflamatorio del melanoma (TIL) pueden suponer una media de un 6% de los linfocitos del TIL asociado al melanoma y que puede alcanzar hasta un 13% en algunos pacientes. Estos linfocitos son CD 4 <sup>bajo</sup> y CD8 <sup>alto</sup> y su fenotipo y la restricción HLA tipo 1 hablan a favor de su origen a partir de LT CD8+. Según estos autores estas células parece que son LTCD8+ que reducen su actividad / marca citotóxica y se enriquecen de un perfil similar a los CD4+.

Señalan que estas células transitan en los tumores como resultado de la secreción de las citoquinas secretadas por las células tumorales y los macrófagos del microambiente tumoral. En estos últimos años la hipótesis de que la ratio entre los distintos subtipos de linfocitos ha adquirido mucha atención como factor pronóstico. Se han utilizado distintos ratios como el CD8 / FOXP3 (efectores/reguladores) y la ratio CD8/CD4 (efectores /colaboradores).

Estas medidas pueden proporcionar una visión más global que nos ayuden a entender que el sistema inmunológico y sus distintos componentes no actúan de manera aislada sino que forman parte de un sistema complejo con distintos balances entre los mismos.

En nuestro estudio no hemos realizado ratios de las distintas subpoblaciones linfocitarias pero consideramos que puede ser un trabajo interesante a realizar en un futuro.

#### **5.3.5 Estudio de linfocitos B CD 20 +:**

Como parte de la caracterización de la respuesta inmunitaria, se investigó también la presencia de LB mediante el estudio IHQ de CD20.

Mientras que hay numerosos estudios en el melanoma sobre linfocitos T, existe muy poca información acerca de la importancia y pronóstico de los linfocitos B asociados al tumor que representan según los estudios alrededor del 33% del TIL <sup>283</sup>.



Los resultados son contradictorios en la literatura, tanto asociada con una mejor supervivencia como asociada a peor pronóstico y desarrollo de metástasis, siendo de estos últimos de los que hay mayor número de estudios y una mayor evidencia. Así en modelos de melanoma murinos la presencia/ actividad de linfocitos B se relacionan con un incremento de la angiogénesis y la inflamación, lo cual se asocia a señalización vía STAT3 y producción de citoquinas <sup>284</sup>.

En estudios realizados en melanoma en cánidos <sup>285</sup> se ha encontrado que la cantidad de LB CD 20 + se asociaban de forma estadísticamente significativa con diversos factores histológicos de mal pronóstico como la tasa mitótica, el pleomorfismo celular y el porcentaje de células pigmentadas. De forma llamativa cuando se encontraba una alta infiltración por linfocitos CD20 +, la supervivencia era menor, se relacionaba con la presencia de metástasis y recurrencias y menor tiempo libre de enfermedad pudiendo considerarse como un factor de mal pronóstico en los tumores melanocíticos caninos.

En estudios realizados en melanomas humanos se ha descrito <sup>286</sup> que la presencia de linfocitos B en el infiltrado del tumor se asocia con resistencia a los tratamientos como los inhibidores de BRAF.

La comunicación entre las células del sistema inmune del organismo y las células malignas puede ocurrir directamente mediante la interacción célula -célula o mediante mediadores solubles como los factores de crecimiento y las citoquinas. De este modo, las células del melanoma humano producen de forma constitutiva el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF2) el cual activa a los linfocitos B del infiltrado tumoral que a su vez producen IGF1.

IGF 1 es crítico en el desarrollo de resistencias a los inhibidores de BRAF y de MEK, de acuerdo con este hallazgo Somasundaram y cols <sup>286</sup> encuentran que los melanomas con resistencia a inhibidores de BRAF/MEK tienen un incremento de linfocitos B CD20 + en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor así como un incremento de la expresión de IGF1. Estos autores señalan que este es un mecanismo de resistencia adquirida a fármacos con importantes implicaciones terapéuticas.

En el meta análisis publicado por Fu Q et al <sup>261</sup> encontraron 3 estudios que cumplían con los requisitos de calidad y encontraron que en 2 de los 3 el TIL con CD20+ con se asociaba con un mejor pronóstico y en 1 no.

En el artículo también reciente, publicado por Castaneda y cols <sup>287</sup> de 2019 estudian el infiltrado linfocitario en distintos tumores (no sólo melanoma) y encuentran que la densidad de LB CD 20+ se asocia de forma significativa con la supervivencia de los pacientes.

En nuestra serie en la gran mayoría de los melanomas primarios encontramos una expresión de CD 20 catalogada como baja. Sólo se encontró una expresión catalogada como alta en 5 casos que correspondían al grupo de los melanomas no metastásicos; sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas y aunque apuntan a un mejor pronóstico en caso de presentar una alta densidad de LB, no podemos sacar conclusiones a este respecto. Sí podemos señalar que el infiltrado de LB en nuestra serie no es predominante en la mayoría de los casos de nuestros pacientes.

#### **5.3.6 Expresión de PD1:**

Otro de los marcadores IHQ que decidimos estudiar en nuestra serie de melanomas metastásicos y no metastásicos es PD1.

La interacción entre las moléculas de PD-1 expresadas en la membrana celular de los linfocitos T efectores y las moléculas de PD-L1 de las CPA (células presentadores de antígeno) es uno de los puntos de control del sistema inmunitario destinados tanto a restringir el daño tisular secundario a la respuesta inmune desencadenada tras una infección o un proceso inflamatorio como a inhibir respuestas autoinmunes <sup>288</sup>.

La unión de PD-L1 al receptor PD-1 es capaz de inhibir la señalización celular mediada por el receptor de células T disminuyendo la interacción de éstas con las células dendríticas, lo que conduce a la anergia. Este bloqueo se produciría también en la respuesta inmune mediada por células T frente a los tumores <sup>289</sup>.

En este sentido se ha postulado que la expresión de PD-L1 por las células neoplásicas es uno de los mecanismos de “escape” del sistema inmune; la interacción entre la molécula de PD-L1 de las células tumorales y el receptor PD-1 de los linfocitos T daría como resultado un cese de actividad linfocitaria antitumoral <sup>290</sup>.

En los tumores, PD-1 y PD-L1 se expresan no sólo en las células neoplásicas, sino también en la mayoría de los TILs. Dicha expresión está además regulada de forma recíproca; así, algunos estudios han demostrado que la expresión de PD-L1 en células tumorales y en células del

sistema inmunitario está fuertemente asociada con la expresión de PD-1 en los TILs. Este hecho indicaría que:

1) La expresión de PD-L1 es el reflejo de la existencia de un microambiente inmunológico reactivo <sup>291</sup>.

2) La presencia de altos niveles de PD-1 en los linfocitos citotóxicos es muy sugestiva de que en dicha circunstancia se está produciendo la proliferación de linfocitos T y la disminución concomitante de producción de citoquinas <sup>292</sup>.

Cada vez hay más estudios sobre PD1 / PD- L1 en melanoma. En líneas generales y aunque lo desglosaremos más adelante la utilidad de la valoración inmunohistoquímica del status PD-L1 en el melanoma avanzado a la hora de seleccionar los pacientes susceptibles de beneficiarse con este tipo de terapia se ha demostrado en algunos estudios. Una mayor tasa global de respuesta, mayor duración del periodo libre de enfermedad y mejor supervivencia global en los pacientes con tumores clasificados como PD-L1 positivos en el estudio inmunohistoquímico frente a aquellos con resultado negativo.

En este sentido, siguiendo la tendencia previamente mencionada de diseñar tratamientos individualizados, se ha propuesto la inclusión en los ensayos clínicos de test inmunohistoquímicos en los que, además de evaluar la expresión de PD-1/PD-L1, se realice la caracterización inmunofenotípica de las células del microambiente tumoral; el análisis de los resultados podría ser de ayuda a la hora de investigar el significado y función de las células inmunes asociadas al tumor

En nuestro trabajo la evaluación de la tinción la hemos realizado mediante el porcentaje de células tumorales positivas para dicho marcador como ha sido descrito por varios autores <sup>293</sup>.

En nuestro estudio hemos evaluado la presencia o ausencia de este inhibidor solamente en el TIL (microambiente tumoral) que es dónde se han tomado los TMAS pero no en las células neoplásicas. Es importante tener en cuenta este hecho a la hora de interpretar los resultados y compararlo con estudios publicados previamente.

La determinación de un punto de corte (o *score*) a partir del cual una neoplasia debe ser considerada positiva para PD-1 o PD-L1 es arbitraria y genera una situación “binaria” irreal; no obstante, hasta la fecha y a la espera del desarrollo de técnicas más precisas, este procedimiento parece ser el más adecuado <sup>294</sup>. Independientemente de la variabilidad de los puntos de corte, las tinciones y los distintos anticuerpos, todos ellos tienen en común que la expresión de estas proteínas predice mejor respuesta a los tratamientos inmunodirigidos.

La positividad individual para PD-1/PD-L1 no ha sido aún bien definida. Algunos autores han basado su evaluación en métodos semicuantitativos análogos al sistema de Allred y cols <sup>295</sup> que es como lo hemos evaluado nosotros tal y como se describe en el apartado de material y métodos.

En nuestro trabajo se ha caracterizado la expresión de PD1 en el infiltrado inflamatorio peritumoral en los 40 pacientes con melanoma metastásico y en los 41 pacientes con melanoma no metastásico, y como observamos, la tinción de PD1 es fundamentalmente de membrana.

De los 162 TMAS de muestras de pacientes en los cuales se ha analizado PD1 en el infiltrado inflamatorio, se ha catalogado como una expresión alta en 43/ 154 pacientes y como baja en 111/154, por lo que podemos decir que en la mayoría de nuestras muestras la expresión de PD1 fue catalogada como baja expresión.

Separando los grupos de metastásico y no metastásicos vemos que tenemos una expresión de PD1 catalogada como alta en un mayor número de muestras en el grupo de los metastásicos en comparación con el grupo de los no metastásicos, con una  $p=0,007$ ; estos resultados son acordes al conocimiento actual ( una expresión alta de PD1 se correlacionaría un mayor riesgo de metástasis y a priori con un peor pronóstico, sin embargo con los tratamientos de inmunoterapia de los que disponemos actualmente serían más susceptibles de recibir estos tratamientos, y el tener una mayor expresión predice una mejor respuesta a los mismos).

Sería interesante valorar en nuestra serie de manera retrospectiva la respuesta de los fármacos con inmunoterapia que han recibido el grupo de los pacientes con melanoma metastásico ya que según los estudios recientes los que tienen una mayor expresión de PD1/PDL1 deberían tener una mejor respuesta a la misma y por lo tanto un mejor pronóstico.

La valoración de PD1/PDL1 tiene importancia de cara a predecir las respuestas a los nuevos fármacos como el nivolumab o el pembrolizumab. Algunos autores al estudiar la expresión de PDL1 encontraron de forma estadísticamente significativa que los pacientes con melanomas PDL1 negativo respondían peor que los que expresaban PDL1 <sup>212,296</sup>.

De forma similar a nuestro trabajo, Taube y cols <sup>291</sup> estudiaron muestras de 110 pacientes con melanoma, 56 metastásicos y 54 primarios, y valoraron la presencia de linfocitos T y expresión de PDL1 .Estos autores identificaron 4 grupos de pacientes:

1.- Pacientes que expresaban PDL 1 y asociaban TIL (infiltrado inflamatorio asociado al tumor), suponían el 41% de los pacientes.

- 2.-Pacientes cuyos tumores expresaban PDL 1 pero no asociaban TIL, suponían el 1% de los pacientes.
- 3.-Pacientes que no expresaban PDL 1 pero si tenían TIL, suponían 13% de los pacientes.
- 4.- Pacientes que no expresaban PDL 1 ni tenían TIL, estos suponían un 45% de los pacientes.

Estos autores sugerían que el tipo de inflamación y el tipo de células infiltrantes podrían influir en la respuesta a los tratamientos.

También se ha sugerido que el tipo de infiltrado inflamatorio puede influir en los sitios en los que metastatizan los melanomas. Así Hamilton y cols <sup>297</sup> estudiaron el perfil genético de distintos genes relacionados con la actividad de las células T y encontraron diferencias en los mismos en los 26 pacientes con melanoma y metástasis cerebrales y extracerebrales. Esto es algo que no hemos analizado en nuestra serie de pacientes metastásicos pero consideramos que es de interés de cara a futuros trabajos.

Kluger HM y cols <sup>266</sup> estudian también la expresión de PDL1 ligando y TIL en las metástasis cerebrales en comparación con la extracerebrales y encuentran que la expresión de PDL 1 era inferior en las metástasis cerebrales y en las cutáneas en comparación con otros sitios, además describen que una alta expresión de PDL1 y células T en las metástasis extracerebrales se asociaban con un tiempo prolongado hasta que desarrollaban metástasis cerebrales.

Otro aspecto a tener en cuenta es la localización del infiltrado inflamatorio y de las células que expresan PD1/PDL1. Así estudios recientes como los publicados por Taube y cols <sup>298</sup> y Tume y cols <sup>101</sup>, demuestran que la localización del infiltrado inflamatorio y de las células que expresan PDL 1 son de mucha importancia, así la presencia de TIL CD8+ y expresión de PDL 1 en el margen invasor del melanoma se asocian a una mayor respuesta a la inmunoterapia. En nuestra serie los TMAs se construyeron utilizando tejido de la zona con mayor inflamación de la muestra estudiada que en la mayoría de los casos coincidía con el margen invasor del melanoma.

La fuerte correlación entre la expresión de PDL 1 y el contenido de células T se sostiene por los hallazgos que hicieron previamente Tume y cols <sup>101</sup> que demostraron la fuerte proximidad entre las células que expresan PDL 1 y las que expresan PD1.

Una limitación de la determinación de PDL 1 es que no permite diferenciar entre la expresión de este ligando en las células del melanoma y los macrófagos y monocitos.

En el estudio publicado por Kakavand H y cols <sup>299</sup> en el cual estudian la expresión de PDL 1 y el infiltrado inflamatorio asociado al tumor y su relación con el desarrollo de metástasis ganglionares, encuentran una fuerte relación entre la expresión de PDL1 ( en las células tumorales) y de PD1 ( en los linfocitos) .

Esta correlación también ha sido encontrada por otros investigadores y sugiere que la presencia de linfocitos que secretan IFN gamma así como otras citoquinas inducen la expresión de PDL 1 en el tumor como parte de una respuesta de evasión del tumor para evitar la respuesta inmune adaptativa <sup>300, 301</sup>.

La expresión de PDL 1 por parte del tumor también puede producirse de manera constitutiva (no inducida por las citoquinas de los linfocitos), aunque parece que esto sólo se produciría en una 5-10% de los casos <sup>301</sup> y estos pacientes podrían tener un mayor beneficio con los inhibidores de PD1/PDL1.

## **5.4 Angiogénesis y linfangiogénesis:**

### **5.4.1 Angiogénesis y linfangiogénesis:**

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos primordiales preexistentes, es el mecanismo fundamental para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Durante este proceso las células endoteliales especializadas, denominadas células líderes, extienden los filopodios y exploran el entorno en busca de indicaciones para orientarse como VEGF- A, las células del tallo siguen a las células líder, se trata de un proceso dinámico en el cual las células endoteliales compiten por la posición de la célula líder <sup>302</sup>.

La angiogénesis en la piel es normal durante la embriogénesis y en cambio los vasos de la piel adulta sana son quiescentes. Sin embargo, la piel adulta conserva la capacidad de iniciar la misma en el contexto de cicatrización, inflamación y como en el caso que nos atañe durante el proceso neoplásico. La angiogénesis se produce como el crecimiento germinal a partir de vénulas postcapilares preexistentes o bien como la remodelación sin germinación de vasos sanguíneos preexistentes. La quiescencia vascular se mantiene por la influencia dominante de inhibidores endógenos, mientras que la angiogénesis es inducida por el aumento de la secreción de factores angiogénicos y/o por la regulación negativa de los factores de la angiogénesis. El principal factor de la angiogénesis cutánea es el VEGF-A. La mayoría de los cánceres cutáneos estudiados hasta el momento se caracterizan por un aumento de la expresión de VEGF –A por las células tumorales y por un incremento de la expresión de VEGF – R (receptor) por los vasos asociados al tumor <sup>303</sup>.

Como se ha detallado en la introducción en 1.5.1.5.3 existen varios marcadores inmunohistoquímicos de células endoteliales sanguíneas (Factor de Von Willebrand, Cd34, Pv1 y CD31).

El sistema linfático cutáneo se desarrolla en paralelo al sistema vascular sanguíneo a través de un proceso denominado linfangiogenia. Este sistema está formado por una red vascular de capilares de paredes finas que drena la linfa del espacio extracelular. Los vasos linfáticos tienen una función importante en la mediación del tráfico de las células inmunitarias desde la piel hasta los ganglios linfáticos regionales y en la diseminación metastásica de las neoplasias malignas cutáneas.

Hasta hace poco los estudios sobre el sistema linfático se veían obstaculizados por la ausencia de marcadores específicos para diferenciar de forma fiable las células endoteliales vasculares linfáticas de las sanguíneas. Actualmente hay marcadores que permiten diferenciar dichas estirpes endoteliales.

Muchos estudios observacionales investigan el significado pronóstico de la angiogénesis y la linfangiogénesis en los pacientes con melanoma. Sin embargo los resultados que se han obtenido son en muchas ocasiones contradictorios, posiblemente por falta de consenso en la metodología

En nuestro estudio hemos utilizado un marcador específico de vasos linfáticos (tiñe de forma fiable y específica los vasos linfáticos pero no los vasos sanguíneos) que es la podoplanina (D2-40) y un pan marcador endotelial vascular que es CD31 (que tiñe todos vasos sanguíneos).

#### **5.4.2 Estudios linfangiogénesis en melanoma:**

El grupo de Dadrás SS y cols<sup>304</sup> fué el primero que en el año 2003 demostró la existencia de linfangiogénesis intra y peritumoral en los melanomas cutáneos primarios y aportó la primera evidencia de que esta linfangiogénesis podía relacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares y con la supervivencia del paciente y, señaló que la densidad de vasos linfáticos peritumorales podía servir como un marcador de riesgo de metástasis ganglionares en los pacientes con melanoma cutáneo primario.

Estos autores estudiaron 19 pacientes con melanoma no metastásico y 18 pacientes con melanomas que habían metastatizado en ganglio linfático y encontraron que la incidencia de linfáticos intratumorales y peritumorales era mayor en los melanomas metastásicos de forma estadísticamente significativa. Describieron que estos últimos tienen más linfáticos, de mayor

tamaño y que cubrían un área significativamente mayor de la zona peritumoral y esto se correlacionaba con menor tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia.

Estudiaron también la densidad de vasos asociados al tumor mediante la detección del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) pero en estos no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los melanomas metastásicos y no metastásicos, aunque es cierto que señalan como limitación del estudio el bajo número de pacientes.

Pettersson A y cols <sup>305</sup> estudiaron la localización de los vasos linfáticos y encuentran que los linfáticos peritumorales, con luz frecuentemente abierta se encuentran a una distancia de 100 micras métricas del borde tumoral en todos los casos. En cuanto a los vasos linfáticos intratumorales describen que presentan una pared fina y una morfología en cesta similar a la descrita en los vasos desarrollados por la inducción de VEGF <sup>305</sup>.

Señalan como aspecto importante que los linfáticos intratumorales los detectaron con mayor frecuencia en los melanomas metastásicos que en los no metastásicos de forma estadísticamente significativa. Con los marcadores estudiados confirman la presencia de linfangiogénesis intratumoral en los melanomas cutáneos primarios. Nosotros en nuestro trabajo no hemos realizado el estudio de los vasos intratumorales, centrándonos sólo en el infiltrado peritumoral, aunque consideramos que sería interesante considerarlo en futuros estudios.

También estudiaron si el grado de linfangiogénesis en los melanomas metastásicos (n=19) se correlacionaba con el grado de inflamación peritumoral (descrita en el estudio anatomopatológico de rutina) y encontraban que el área cubierta por vasos linfáticos era significativamente mayor en los melanomas con un infiltrado inflamatorio descrito como “no energético” en comparación con los que presentaban un infiltrado inflamatorio “energico”

Nosotros decidimos estudiar la densidad de linfáticos peritumorales D2-40+ basándonos en el artículo de Pastuhenko L y cols <sup>306</sup> de 2015 quienes para estudiar la importancia pronóstica de la angiogénesis y la linfangiogénesis en los pacientes con melanoma realizaron un estudio retrospectivo siguiendo las recomendaciones de consenso para la detección de linfangiogénesis y angiogénesis en tumores sólidos y los criterios de recomendaciones para marcadores tumorales (REMARK) para la descripción de los resultados.

Ellos utilizan el score de Chalkley para vasos linfáticos y sanguíneos y encuentran en el análisis multivariante que el score de Chalkley para D2-40 era el mejor predictor de afectación linfática



y de metástasis a distancia, así como de tiempo libre de enfermedad y supervivencia global en los pacientes con melanoma y concluyen que debería incluirse este índice en los informes de rutina de anatomía patológica, ya que aportaría información adicional para identificar a los pacientes de alto riesgo.

Previamente en su meta-análisis de 2014<sup>129</sup> describieron el significado pronóstico de la densidad de vasos linfáticos peritumorales, y señalaron en esta publicación que muchos de los estudios incluidos no seguían las recomendaciones de REMARK para describir los biomarcadores y que por lo tanto no podían extraerse conclusiones significativas.

Afirmaban que es importante en los estudios seguir la metodología de consenso para evaluar la linfangiogénesis y la angiogénesis de tumores sólidos<sup>307</sup> así como las recomendaciones REMARK para presentar resultados<sup>308</sup>.

En el trabajo de Patushenko y cols<sup>306</sup> siguiendo el método de Chalkley para la detección tanto de los vasos linfáticos como los vasos endoteliales, los vasos sanguíneos y linfáticos peritumorales se definieron como los CD 31 + o los D2-40 positivos localizados en la interfase o en la dermis adyacente. Se consideraron vasos peritumorales aquellos que se encontraban a una distancia máxima de una cuadrícula de Chalkley de diámetro con una magnificación x 200 desde la periferia del tumor. No se consideró necesaria la presencia de luz vascular para identificar los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos con el objetivo de no excluir pequeños vasos que se pudieran estar generando.

Para la puntuación de Chalkley cuantificaron escaneando una sección completa con una cuadrícula ocular que contiene 25 puntos posicionados al azar que es girado para que coincidan con el mayor número de puntos que muestran tinción. Para el análisis se calculó la media de 3 puntuaciones de Chalkley. La densidad de los microvasos tanto vasculares como linfáticos se recogió de acuerdo con la técnica de Weidner<sup>309</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, el método de Chalkley requiere un accesorio especial que se denomina “rejilla de punto de Chalkley” que tiene 25 puntos distribuidos al azar y se monta sobre un microscopio óptico, este puede ser rotado 360° y cambiando la angulación el observador puede encontrar la posición única que coincida con la mayor cantidad de superposiciones entre los puntos y los vasos teñidos. La puntuación de Chalkley total se calcula como la media de las tres mediciones realizadas más altas. Se ha demostrado que donde se encuentran el mayor número de estos puntos es directamente proporcional a la densidad de microvasos en el área<sup>310</sup>.

El tiempo para realizar esta técnica depende del tamaño del tumor, y de la experiencia del patólogo, en su estudio el tiempo varió entre 40 segundos y 6,2 minutos con una media de tiempo por evaluación de 2,2 minutos que potencialmente podría ser reducida por la determinación de la puntuación de Chalkley sólo en el “punto caliente” o “hot spot” de la sección. Recientemente también se han realizado estudios para hacerlo de forma automatizada mediante simulaciones con ordenador <sup>311</sup>.

En nuestro trabajo el conteo de vasos linfáticos se realizó de forma manual para dar una cifra numérica, lo que podría ser una limitación.

De manera llamativa y en discordancia con lo descrito anteriormente, en nuestra serie de pacientes encontramos una media de número de vasos linfáticos similar en el grupo de los melanomas metastásicos y no metastásicos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el análisis univariante de las variables. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que en nuestro trabajo sólo estudiamos melanomas gruesos con un índice de Breslow > 1 mm en los cuales es posible que ya se hubiera iniciado el proceso de linfangiogénesis de manera similar. Vemos que cuando analizamos este dato en función de la edad tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas que puedan explicar este hecho.

Curiosamente cuando introducimos la variable de D2-40 en los árboles de decisión de *Machine learning* en los cuales se realiza un análisis multivariante, sí que se tiene en cuenta el valor de D2-40 para clasificar a los pacientes como si van a desarrollar metástasis o no incluyéndolo como la tercera variable en importancia después de CD8 y de CD31 en el árbol de decisión en el que no se tiene en cuenta el índice de Breslow, y como 6ª variable en importancia cuando sí se tiene en cuenta el índice de Breslow (detrás del índice de Breslow, CD31, CD8, PD1 y CD4).

#### **5.4.3 Estudios angiogénesis en melanoma:**

En el anteriormente artículo citado de Patushenko y cols <sup>306</sup> no encontraron asociaciones en el análisis multivariante entre los parámetros estudiados en angiogénesis y la evolución clínica de los pacientes, lo que es concordante con los datos encontrados por Barnhill y cols <sup>312</sup> y los resultados del meta-análisis mencionado anteriormente <sup>129</sup>.

Sin embargo, las puntuaciones de Chalkley para vasos sanguíneos, la densidad de microvasos y la fracción de proliferación endotelial se asociaron con datos de mayor agresividad del melanoma como el índice de Breslow y la tasa de mitosis.

En nuestro trabajo, contrariamente a lo que hemos encontramos con los vasos linfáticos encontramos, una media de vasos sanguíneos superior en el grupo de los melanomas metastásicos en comparación con el grupo de los melanomas no metastásicos con diferencias

estadísticamente significativas  $p < 0,001$ . La importancia de los vasos sanguíneos medidos por CD31 vuelve a estar presente cuando observamos los árboles de decisión, siendo tanto en el que tiene en cuenta el índice de Breslow como el que no, la primera o la segunda variable en importancia respectivamente. Por lo tanto, consideramos el número de vasos sanguíneos determinados mediante CD31 como un componente del endofenotipo de cada uno de nuestros pacientes con melanoma, siendo fundamental a la hora de predecir si va a desarrollar metástasis o no.

Hasta el momento no está claro por qué la diseminación por vasos linfáticos parece ser una vía preferente para la diseminación del melanoma incluso en aquellos tumores que disponen de una rica red vascular.

Apoya esta teoría el hecho de que se ha visto que la invasión de los vasos linfáticos ocurre en el melanoma más frecuentemente que la diseminación por vía sanguínea (un 27% vía linfática vs 4% vía sanguínea)<sup>313</sup>. Una posible explicación para estos hallazgos pueden ser las diferencias estructurales que se encuentran entre los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos, ya que los pequeños vasos linfáticos carecen de las estrechas uniones interendoteliales que se ven en los vasos sanguíneos y también carecen de las capas circundantes de pericitos, células de músculo liso y membranas basales<sup>314</sup>, lo que hace que de alguna manera estos sean más frágiles y se puedan producir fugas por los mismos más fácilmente.

Otro factor que pudiera influir es que las células de los vasos linfáticos expresan SLC/CCL21 que es un ligando para el receptor de la quimiocina 7 que se expresa en las células del melanoma, y esta interacción ligando-receptor está implicado el reclutamiento de células dendríticas maduras desde los espacios intersticiales de los vasos linfáticos<sup>315</sup>.

Además, en modelos murinos se ha sugerido que las redes intratumorales de vasos linfáticos podrían no ser funcionantes y que con sólo los linfáticos en el margen del tumor podría ser suficiente para el desarrollo de metástasis<sup>316</sup>.

### **5.5 *Machine learning* o aprendizaje automático:**

Las nuevas tecnologías pueden aportar mucho en el campo de la medicina y es necesario que aprendamos a familiarizarnos con estas ellas.

Los sistemas de aprendizaje automático se basan en modelos de redes neuronales: imitan la forma en que las neuronas funcionan en nuestro cerebro, son una herramienta muy potente para clasificar y escudriñar ingentes cantidades de datos, el sistema aprende a partir de los ejemplos, aunque de momento es un proceso laborioso y de alto coste.

El *Machine Learning* es una rama de la inteligencia artificial y es lo que hemos utilizado en este trabajo. Lo que hace es utilizar algoritmos en el sistema de diagnóstico que nos puede llevar a importantes mejoras en la predicción de enfermedades; en concreto nosotros la hemos utilizado con el objetivo de predecir en nuestros pacientes si van a desarrollar metástasis o no.

En el campo del melanoma el hecho fundamental es que nuestros pacientes desarrollan metástasis y fallecen por las mismas. En nuestro trabajo la serie está limitada a pacientes con melanomas gruesos con un índice de Breslow  $> 1$  mm, que sabemos que ya por este grosor tumoral tienen un riesgo elevado de metástasis. Aun así vemos que con índices altos de Breslow hay pacientes que desarrollarán metástasis y pacientes que no, por lo que es importante identificar el “endofenotipo” de estos.

Debemos señalar que hay un porcentaje de pacientes con melanomas finos (con índice de Breslow  $< 1$  mm) que desarrollaran metástasis, según las series hasta el 20% de los pacientes. Consideramos que en este grupo de pacientes sería muy interesante la aplicación de estos algoritmos para intentar identificarlos y poder actuar de forma precoz incluso en función del perfil IHQ del infiltrado asociado al tumor plantear tratamiento con “ inmunoterapia preventiva” ¿ será posible en un futuro próximo evitar el desarrollo de metástasis en algunos de nuestros pacientes con melanoma?.

En los casos de *Machine learning* o aprendizaje automático, los sistemas “aprenden” cuando se dan las condiciones (según los datos que le estés dando, en este caso la expresión de IHQ de distintos marcadores) para que un paciente con melanoma desarrolle metástasis o no. En nuestro caso utilizando un panel de IHQ que no es una tecnología cara y que puede ser accesible a la mayoría de los hospitales (a diferencia de otras técnicas como el FISH / HGC) las cuales están muy lejos de ser accesibles y por lo tanto útiles para la mayoría de los hospitales. Buscamos por lo tanto biomarcadores baratos y accesibles que nos sirvan para valorar/predecir el pronóstico de nuestros pacientes.

El hecho de predecir qué pacientes van a desarrollar metástasis o no (antes de que las desarrollen) podría ayudarnos a tratarlos en las etapas más iniciales, e incluso predecir cuáles son los tratamientos más adecuados para cada paciente, evitando gastos, sufrimiento y fallecimientos innecesarios.

En nuestro trabajo hemos desarrollado varios árboles de decisión, el primero sin tener en cuenta el índice de Breslow de los melanomas primarios, solamente incluyendo las IHQ realizadas en el trabajo (CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD20, CD31 y D2-40). Así vemos que los valores que encuentra como importantes de cara a predecir que se vayan a desarrollar

metástasis son un número de vasos sanguíneos ( $CD31 > 19$ ) según el cual los pacientes desarrollarían metástasis. En caso de que  $CD31 < 19$  habría que valorar CD8.

Si CD 8 es catalogado como alta expresión, tendría importancia la valoración de PD1, de tal manera que:  $CD31 < 19 + CD8 \text{ alto} + PD1 \text{ bajo}$ , nuestro paciente no desarrollaría metástasis

Si CD 8 es catalogado como alta expresión, y PD1 alto, tendría importancia la valoración de D2-40, así:

\* $CD31 < 19 + CD8 \text{ alto} + PD1 \text{ alto} + D2-40 < 5$ : nuestro paciente desarrollaría metástasis.

\* $CD31 < 19 + CD8 \text{ alto} + PD1 \text{ alto} + D2-40 > 5$ : nuestro paciente no desarrollaría metástasis.

Es interesante que con los árboles de decisión pasan a tener importancia variables que cuando hemos realizado el estudio estadístico univariante no la tenían como por ejemplo D 2-40.

Resaltar sin embargo que las 2 variables de mayor importancia son CD31 y CD8, que son 2 de los marcadores IHQ en los cuales hemos encontrado más diferencias con el análisis estadístico clásico.

Aunque la utilización de árboles de decisión es una herramienta pionera e innovadora, es importante señalar que este árbol no es perfecto y que falla al clasificar a los melanomas metastásicos en 25/100 y a los no metastásicos en 22/100, pero es una cuestión de número de datos : que funcione de forma adecuada el *Machine Learning* necesita una cantidad ingente de datos, por eso vemos en nuestro trabajo que los árboles de decisión fallan en un porcentaje (en este caso no desdeñable) de casos, este hecho se solucionaría aumentando la n (número de casos/ pacientes que se estudian). Sería necesario la realización de estudios multicéntricos para poder incrementar esta n y conseguir árboles de decisión con mejores sensibilidades y especificidades.

Si incorporamos a los árboles de decisión el índice de Breslow, vemos que la capacidad de clasificar a los pacientes en dos grupos (como si van a desarrollar metástasis o no) mejora, de tal manera que fallamos al clasificar a los metastásicos 19/100 y en clasificar a los no metastásicos en 12/100. Vemos que la variable más importante en este caso pasa a ser el índice de Breslow, seguido de CD31 y CD8.

Se pueden realizar otros árboles de decisión, nosotros intentamos crear uno que nos permitiera predecir el índice de Breslow a partir de los datos de la IHQ, pero por el escaso número de pacientes y la gran variabilidad (variable cuantitativa continua) del propio índice de Breslow hizo que no se pudieran sacar conclusiones.

Quizás la puerta más importante que se nos abre con este trabajo es la posibilidad de incrementar el número de pacientes que estudiamos (bien en nuestro propio centro, bien en colaboración con otros hospitales) de manera que se puedan implementar los algoritmos que hemos conseguido obtener de tal manera que no fallen (evitando la variabilidad humana).

El funcionamiento de estas técnicas está en íntima relación con el BIG DATA, otra de las herramientas de la inteligencia artificial, que realmente es algo que muchos hospitales ya están utilizando y que empieza con la digitalización (que es algo que ya está implementado en casi todos los hospitales).

Es importante señalar que la inteligencia artificial no va a sustituir a los médicos, sino que se presenta como un aliado que nos puede liberar de tareas monótonas.

## **6. NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

Al realizar el trabajo nos hemos planteado nuevas líneas de investigación futura como:

- 1.- Estudio genético, a tenor de los conocimientos actuales de la serie de melanomas de nuestro hospital, relacionarlo con la localización de los mismos y el desarrollo sí/no de metástasis.
- 2.- Posibilidad de estudiar en los melanomas metastásicos el infiltrado inflamatorio en el primario y compararlo con el de las metástasis subsecuentes.
- 3.- Ampliar la base de datos e incluir a los melanomas finos (<1 mm de Breslow) estudiando en los mismos los mismos marcadores de este estudio o ampliados, con el objetivo de identificar melanomas finos que puedan dar lugar a metástasis, sobre todo estadios Ib, IIa, IIb, IIc que suponen aproximadamente un 20% de los melanomas que dan metástasis.
- 4.- Estudio de las variantes poco frecuentes de melanoma, spitzoide, epiteloide, nevoide, nevus azul maligno (estudio genético y estudio del infiltrado inflamatorio). Estudio de los melanomas uveales /mucosas.
- 5.- En nuestro estudio no hemos valorado el angiotropismo, aunque consideramos que puede ser una línea interesante de investigación para futuros trabajos. Intentar relacionar/ conocer la relación entre la diseminación intravascular y extravascular del melanoma podría ayudarnos a valorar/ predecir cuales de nuestros pacientes tiene riesgo de desarrollar metástasis.
- 6.- Incluir en futuros estudios analizar el rol de los macrófagos mediante IHQ (CD 68/ CD163) en estroma y en zona tumoral, ya que estudios crecientes que señalan un papel frente al melanoma e importancia pronóstica.
- 7.-Disponer de los algoritmos obtenidos mediante métodos automatizados de machine learning para estudio de los componentes del infiltrado inflamatorio asociado al tumor con mayor número de pacientes para limitar la variabilidad ocasionada por la evaluación por humanos.
- 8.- Estudiar los ratios de las distintas poblaciones linfocitarias.
- 9.-Valorar en el grupo de los melanomas metastásicos de manera retrospectiva la respuesta a los fármacos con inmunoterapia función de la expresión de PD1 que expresaban.
- 10.- Valorar en el grupo de los melanomas metastásicos la relación entre la expresión de los distintos marcadores utilizados y el sitio en que se han producido las metástasis.



11.- Estudio de los linfáticos tanto peritumorales como intratumorales y relacionarlo con el riesgo de desarrollo de metástasis.

12.- Incluir en estudios con mayor número de pacientes y utilizando las técnicas de aprendizaje automático pacientes con melanomas finos ( $<1$  mm) con el objetivo de predecir si van a desarrollar metástasis o no y de esta forma poder realizar un mejor manejo de los mismos o incluso plantear tratamientos preventivos.

13.- Realización de estudios multicéntrico con el objetivo de incrementar el número de pacientes a incluir en los árboles de decisión de tal manera que podamos incrementar la sensibilidad y especificidad de los mismos y convertirlos en herramientas útiles aplicables a la práctica clínica real.

## **7. RELEVANCIA Y LIMITACIONES**

Consideramos que se trata de un trabajo importante, ya que no se han realizado trabajos similares de estudio del TIL, valoración IHQ y de vasos linfáticos y sanguíneos en melanomas de población española. Asimismo el número de trabajos que comparan melanomas metastásicos y no metastásicos es muy escaso y en muchas ocasiones con limitaciones en la metodología. Remarcar que es la primera vez que se utiliza la inteligencia artificial para apoyarnos en el estudio del TIL y creación de árboles y bosques de decisión.

Entendemos el trabajo como un trabajo exploratorio, por las limitaciones que presenta, fundamentalmente:

- 1.-Sesgo a la hora de seleccionar a los controles, ya que se seleccionaron de forma aleatoria seleccionando a los primeros 40 pacientes con melanoma no metastásico que fueron diagnosticados en el periodo de tiempo seleccionado y cumplían los criterios señalados en material y métodos. No se realizó pareamiento de pacientes por ningún criterio clínico o anatomopatológico, por lo que es posible que las diferencias encontradas entre ambos grupos pudieran deberse a diferencias entre ambos grupos que no hayamos recogido. Esto nos abre la puerta a diseñar nuevos trabajos de investigación en la que se elijan los controles y los casos en función del estadio clínico de la AJCC.
- 2.- Pequeño tamaño muestral (81 pacientes), lo cual limita los resultados, siendo óptimo el incremento de tamaño muestral a 218 para mayor potencia estadística.
- 3.- Se trata de un estudio retrospectivo utilizado muestras de anatomía patológica.
- 4.- El hecho de que la evaluación de las muestras tanto con HE como las IHQ estaban sujetas a la propia heterogeneidad de las muestras. Para intentar disminuir esta variabilidad tomamos 2 muestras de cada uno de los melanomas y estas fueron evaluadas por dermatopatólogos expertos que eran ciegos para los datos clínicos. De forma notable los dermatopatólogos eran capaces de evaluar el TIL y las tinciones IHQ en áreas representativas de los melanomas
- 5.-Las limitaciones a las que está sujeto el Machine Learning, ya que las máquinas cometen errores distintos a los que comenten los humanos que hay que aprender, su principal desventaja está en el reto que supone su desarrollo, que no está totalmente desarrollado. Señalar también que las máquinas sólo pueden responder cuando se les da una información que conocen, pero no pueden reaccionar ante una información desconocida o un evento imprevisto.

## **8. CONCLUSIONES**

- 1) Los melanomas primarios metastásicos tienen un TIL catalogado como ausente o “no enérgico” en la mayoría de los casos estudiados.
- 2) Los melanomas primarios no metastásicos tienen un TIL catalogado como “enérgico” en la mayoría de los casos estudiados.
- 3) El infiltrado inflamatorio asociado al tumor en nuestra serie de melanomas está compuesto en su mayoría por linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) siendo muy escasos los linfocitos B o las células NK.
- 4) El TIL en los melanomas metastásicos tiene una expresión de CD4 y CD8 catalogada como baja en la mayoría de los casos, mientras que los melanomas no metastásicos tienen una expresión de CD4 y CD8 catalogada como alta en la mayoría de los casos.
- 5) La expresión de PD1 es mayor en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor en los melanomas metastásicos que en el TIL de los melanomas no metastásicos, en nuestra serie.
- 6) En los melanomas metastásicos encontramos un incremento de vasos sanguíneos en comparación con los melanomas no metastásicos, sin embargo no encontramos diferencias en el número de vasos linfáticos.
- 7) Si nos apoyamos en las técnicas de “Machine learning” los marcadores de IHQ que mayor relevancia tienen a la hora de predecir si un paciente va a desarrollar metástasis o no son el índice de Breslow, la cuantificación de vasos sanguíneos mediante CD31 y la cantidad de linfocitos T citotóxicos cuantificada mediante expresión con CD8.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- 1- Weinstock MA. Issues in the epidemiology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998 Aug; 12(4):681-98
2. - Boniol M, Sallin J, Doré JF. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer.* 2000 Sep 15; 89(6):1269-78
3. - Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer.* 1966 May; 19(5):607-10
- 4.- Laennec R: Sur les melanoses. *Bulletin de Faculte de Medicine Paris.*1806; 1:24
5. – Karamanou M, Liappas I, Stamboulis E, Lymperi M, Kyriakis K, Androutsos G. Sir Robert Caswell (1793-1857): coining the term “melanoma”. *J BUON.*2012. Apr-Jun; 17(2):400-2
6. - Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. “the B-K mole synddrome”. *Arch Dermatol.* 1978 May; 114(5):732-8
- 7.- Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol.* 2003 Nov; 163(5):1765-70
8. - T.L. Diepgen, V. Mahler. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 2002 Apr: 146 Suppl 61: 1-6
9. - Z. Ali, N. Yousaf, J. Larkin. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl.* 2013 Sep; 11(2):81-91
- 10.- Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García CC, Rodriguez-Pazos L, Pastushenko I, Marcos-Gragera R, Garcia-Doval I.  
Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016 May; 107(4):318-28
11. - V.A. Albert, H.K. Koh, A.C. Geller, D.R. Miller, M.N. Prout, R.A. Lew. Years of potential life lost: Another indicator of the impact of cutaneous malignant melanoma on society. *J Am Acad Dermatol.* 1990 Aug; 23 (2Pt1):308-310
12. - Armstrong BK, Kricker A. How much melanoma is caused by sun exposure?  
*Melanoma Res.* 1993 Dec; 3(6):395-401

13. - Suppa M, Gandini S. Sunbeds and melanoma risk: time to close the debate. *Curr Opin Oncol.* 2019 Mar; 31(2):65-71
14. - Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M. EUROCaRE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94: results and commentary. *Ann Oncol.* 2003; 14 Suppl 5:v61-118
15. - Crombie IK. Variation of melanoma incidence with latitude in North America and Europe. *Br J Cancer.* 1979 Nov; 40(5):774-81
16. - Bulliard JL, Cox B, Elwood JM. Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. *Cancer Causes Control.* 1994 May; 5(3):234-40
17. - Ortonne JP MD, Fitzpatrick TB: skin colour and the melanin pigmentary system. New York: Plenum Medical Book: 1-35, 1983.
18. - Lens MB, Daves M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2004 Feb; 150(2):179-85
19. - Sargen MR, Kanetsky PA, Newton-Bishop J, Hayward NK. Histologic features of melanoma associated with CDKN2A genotype. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Mar; 72(3):496-507
- 20.- DE Simone P, Valiante M, Silipo Familial melanoma and multiple primary melanoma. *G Ital Dermatol Venereol.* 2017 Jun; 152(3):262-265
21. - Menzies S, Barry R, Ormond P. Multiple primary melanoma: a single centre retrospective review. *Melanoma Res.* 2017 Dec; 27(6):638-640.
22. - Pizarro Á, Santiago JL, Santiago DI. Dermoscopy in the prevention and early diagnosis of melanoma: a biological perspective. *Actas Dermosifiliogr.* 2015 Jan-Feb; 106(1):3-6
23. - Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol.* 2003 Mar; 139(3):282-8
24. - Kregel S, Reyes-Múgica M. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi. *Br J Dermatol.* 2017 May; 176(5):1114
- 25.-Kinsler VA, O'Hare P, Bulstrode N, Calonje JE. Melanoma in congenital melanocytic naevi. *Br J Dermatol.* 2017 May; 176(5):1131-1143
- 26.- Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry D 4 th, Clark WH Jr. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997 May 14; 277(18):1439-44



27. - Tsai S, Balch C, Lange J. Epidemiology and treatment of melanoma in elderly patients. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Mar; 7(3):148-52
- 28.- Garcovich S, Colloca G, Sollen P, Andrea B. Skin Cancer Epidemics in the Elderly as an Emerging Issue in Geriatric Oncology. *Aging Dis*. 2017 Oct 1; 8(5):643-661
- 29.- Iglesias-Pena N, Paradelo S, Tejera-Vaquero A, Boada A y cols. Cutaneous melanoma in the elderly: review of a growing problem. *Actas Dermosifiliogr*. 2019 Jul - Aug; 110(6):434-447
- 30.- Fulop T, Kotb R, Fortin CF, Pawelec G, de Angelis F, Larbi A. Potential role of immunosenescence in cancer development. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jun; 1197:158-65
- 31.- Weiss SA, Han J, Darvishian F, Tchak J, Han SW, Malecek K, Krogsgaard M, Osman I, Zhong J. Impact of aging on host immune response and survival in melanoma: an analysis of 3 patient cohorts *J Transl Med*. 2016 Oct 19;14(1):299
32. - Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969 Mar; 29(3):705-27.
33. - Reed RJ, Martin P. Variants of melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Jun; 16(2):137-58
34. - O. Stevenson, I. Ahmed. Lentigo maligna. Prognostic and treatment options. *Am J Clin Dermatol*. 2005; 6(3): 151-164
35. - Mc Kenna JK, Florell SR, Goldman GD. Bowen GM. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current estate of diagnosis and treatment. *Dermatol Surg*. 2006 Apr; 32(4):493-504
36. – Charles CA, Yee VS, Dusza SW, Marghoob AA, Oliveria SA, Kopf A, Rigel D, Halpern AC. Variation in the diagnosis, treatment, and management of melanoma in situ: a survey of US dermatologists. *Arch dermatol*. 2005 Jun; 141 (6):723-9
37. – Kelly JW. Following lentigo maligna may not prevent the development of life-threatening melanoma. *Arch Dermatol*. 1992 May; 128(5):657-60
38. - Akay BN, Kocyigit P, Heper AO, Erdem C. Dermoscopy of flat pigmented facial lesions: diagnostic challenge between pigmented actinic keratosis and lentigo maligna. *Br J Dermatol*. 2010 Dec; 163 (6): 1212-7
- 39.- Schiffner R, Schiffner-Rohe J, Vogt T, Landthaler M, Wlotzke U, Cagnetta AB, Stolz W. Improvement of early recognition of lentigo maligna using dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan; 42(1 Pt 1):25-32
40. - Ahlgrim-Siess V, Massone C, Scope A, Fink-Puches R, Richtig E, Wolf IH, Koller S, Gerger A, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R. Reflectance confocal microscopy of facial lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: a preliminary study. *Br J Dermatol*. 2009 Dec; 161(6):1307-16
41. - Cohen LM, McCall MW, Zax RH. Mohs micrographic surgery for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. A follow-up study. *Dermatol Surg*. 1998 Jun; 24(6):673-7

42. - Zalaudek I, Horn M, Richtig E, Hödl S, Kerl H, Smolle J. Local recurrence in melanoma in situ: influence of sex, age, site of involvement and therapeutic modalities. *Br J Dermatol.* 2003 Apr; 148(4):703-8
43. - PH McKee EC: *Pathology of the skin with clinical correlations.* Elsevier Mosby 3rd edition Vol 2. 2005
44. - Weedon D: *Skin Pathology.* Elsevier Science limited chapter 32, 2010
45. - Goydos JS, Shoen SL. Acral lentiginous melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016; 167:321-9
46. - Merkel EA, Gerami P. Malignant melanoma of sun-protected sites: a review of clinical, histological, and molecular features. *Lab Invest.* 2017 Jun; 97(6):630-35
47. - Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015; 161:1681–96
48. - Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012; 44:1006–14
49. - Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018 Jan; 34(1):13-24
- 50.- Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med.* 2015 Nov 12; 373(20):1926-36
51. - Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar; 29(3):705-27
52. - Gimotty PA, Guerry D, Ming ME, Elenitsas R, Xu X, Czerniecki B, Spitz F, Schuchter L, Elder D. Thin primary cutaneous malignant melanoma: a prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American Joint Committee on Cancer staging. *J Clin Oncol.* 2004 Sep 15; 22(18):3668-76
53. - Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970 Nov; 172(5):902-8
- 54.- Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer.* 1996 Aug 1; 78(3):427-32
- 55.- Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton A Jr, Kirkwood JM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer.* 2000 Mar 15; 88(6):1484-91
- 56.- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20; 27 (36):6199-206

- 57.- Mervic L, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Forschner A, Metzler G, Bartenjev I, Büttner P, Garbe C. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma Res.* 2011 Jun; 21(3):244-52
58. - Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruiter DJ, Barnhill RL. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer.* 2003 Sep; 39(13):1861-5
- 59.- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 15; 19(16):3622-34.
60. - AJCC cancer staging manual. 8th Ed.
- 61.- MC Garrido Ruiz J Rodriguez Peralto: Factores pronósticos del melanoma. *Rev Cancer* 21,2007
- 62.- Scolyer RA, Shaw HM, Thompson JF, Li LX, Colman MH, Lo SK, McCarthy SW, Palmer AA, Nicoll KD, Dutta B, Slobedman E, Watson GF, Stretch JR. Interobserver reproducibility of histopathologic prognostic variables in primary cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol.* 2003 Dec; 27(12):1571-6
63. - Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM; American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann Surg Oncol.* 2010 Jun; 17(6):1475-7
64. - Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther.* 2005 Sep-Oct; 18(5):369-85
- 65.- Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Sondak VK. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1; 29(16):2199-205
66. - Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Melanoma of the skin. In: Edge SE, Byrd DR, Carducci MA, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2009. p. 325-44
- 67.- Mandalà M, Galli F, Cattaneo L, Merelli B, Rulli E, Ribero S, Quaglino P, De Giorgi V, Pigozzo J, Sileni VC, Chirco A, Ferrucci PF, Occelli M, Imberti G, Piazzalunga D, Massi D, Tondini C, Queirolo P; Italian Melanoma Intergroup. Mitotic rate correlates with sentinel lymph node

status and outcome in cutaneous melanoma greater than 1 millimeter in thickness: A multi-institutional study of 1524 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Feb; 76(2):264-273.e2

68.- Knezevich SR, Barnhill RL, Elder DE, Piepkorn MW, Reisch LM, Pocobelli G, Carney PA, Elmore JG. Variability in mitotic figures in serial sections of thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Dec; 71(6):1204-11

69. - Day CL Jr, Harrist TJ, Gorstein F, Sober AJ. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*. 1981 Jul; 194(1):108-12

70.- Kopf AW, Welkovich B, Frankel RE, Stoppelman EJ, Bart RS, Rogers GS, Rigel DS, Friedman RJ, Levenstein MJ, Gumport SL, et al. Thickness of malignant melanoma: global analysis of related factors. *J Dermatol Surg Oncol*. 1987 Apr; 13(4):345-90, 401-20

71. - Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24; 454(7203):436-44

72. - Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16; 348(3):203-13

73. - Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Dec 20; 81(24):1893-904

74.-Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*. 1996 Jan; 74(1):43-7

75.- Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, Berwick M. Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*. 2001 Jun; 115(6):856-60

76.- Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 20; 30(21):2678-83

77. - Eriksson H, Frohm-Nilsson M, Järås J, Kanter-Lewensohn L, Kjellman P, Månsson-Brahme E, Vassilaki I, Hansson J. Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: results of a large population-based study. *Br J Dermatol*. 2015 Jan; 172(1):175-86

78. - Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma,

Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol*. 2017 Nov; 24(6):311-335

79. - Pandolfi F, Boyle LA, Trentin L, Kurnick JT, Isselbacher KJ, Gattoni- Celli S. Expression of HLA-A2 antigen in human melanoma cell lines and its role in T-cell recognition. *Cancer Res*. 1991 Jun 15; 51(12):3164-70

80. - Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004 Mar 15; 22(6):1136-51

81. - Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999 Mar; 10(3):281-7

82.-Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015 Apr 3; 348(6230):69-74

83. - Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest*. 1996 Oct 1; 98(7):1633-41

84.- Solana R, Casado JG, Delgado E, DelaRosa O, Marín J, Durán E, Pawelec G, Tarazona R. Lymphocyte activation in response to melanoma: interaction of NK-associated receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Jan; 56(1):101-9

85.-Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 1996 Nov 22; 274(5291):1363-6

86. - Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*. 2001 Oct; 7(10):1118-22

87. - Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, Levitsky HI. Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood*. 2001 Aug 15; 98(4):1070-7

88. - Becker JC, Brabletz T, Czerny C, Termeer C, Bröcker EB. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. *Int Immunol*. 1993 Dec; 5(12):1501-8

- 89.-Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Chen L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005 Feb 1; 65(3):1089-96
90. - Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Dec; 57(12):1795-805
- 91.- Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creyten D, van der Schaft DW, Winnepeninckx V, Griffioen AW. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Jan; 57(1):97-106
92. – Martinez-Rodriguez M, Thompson AK, Monteagudo C. A significant percentage of CD20-positive TILs correlates with poor prognosis in patients with primary cutaneous malignant melanoma. *Histopathology.* 2014 Nov; 65(5):726-8
- 93.- Van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, Vos WM, de Gruijl TD, Molenkamp BG, van den Eertwegh AJ, Hooijberg E, van Leeuwen PA, Meijer CJ, Oudejans JJ. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer.* 2008 Aug 1; 123(3):609-15
94. - Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, Rubegni P, Mannucci S, Monciatti I, Cosci E, Tosi P, Luzi P. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep.* 2007 Nov; 18(5):1115-22
- 95.- Duprat JP, Brechtbühl ER, Costa de Sá B, Enokihara M, Fregnani JH, Landman G, Maia M, Riccardi F, Belfort FA, Wainstein A, Moredo LF, Steck H, Brandão M, Moreno M, Miranda E, Santos ID. Absence of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Is a Reproducible Predictive Factor for Sentinel Lymph Node Metastasis: A Multicenter Database Study by the Brazilian Melanoma Group. *PLoS One.* 2016 Feb 9; 11(2):e0148160
- 96.- Kruper LL, Spitz FR, Czerniecki BJ, Fraker DL, Blackwood-Chirchir A, Ming ME, Elder DE, Elenitsas R, Guerry D, Gimotty PA. Predicting sentinel node status in AJCC stage I/II primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 2006 Nov 15; 107(10):2436-45
- 97.- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988 Dec 22; 319(25):1676-80

98. - Ladányi A, Somlai B, Gilde K, Fejös Z, Gaudi I, Tímár J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15; 10(2):521-30
99. - Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Sep; 56(9):1459-69
100. - Ladányi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejös Z, Gaudi I, Dobos J, Tímár J. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Dec; 60(12):1729-38
101. - Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014 Nov 27; 515(7528):568-71
- 102.- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014 Jan; 232(2):199-209
- 103.- Weiss SA, Han SW, Lui K, Tchack J, Shapiro R, Berman R, Zhong J, Krogsgaard M, Osman I, Darvishian F. Immunologic heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. *Hum Pathol.* 2016 Nov; 57:116-125
104. - Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19; 473(7347):298-307
- 105.- Barnhill RL, Fandrey K, Levy MA, Mihm MC Jr, Hyman B. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest.* 1992 Sep; 67(3):331-7
- 106.- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR 3rd. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 1; 20(7):1826-31

107. – Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18; 285(21):1182-6
- 108.- Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, Trinchieri G, Dubinett SM, Mao JT, Szabo E, Krieg A, Weiner GJ, Fox BA, Coukos G, Wang E, Abraham RT, Carbone M, Lotze MT. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother.* 2010 May; 33(4):335-51
109. - Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Feb; 21(1):33-9
110. - Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2010 Jan 1; 15:166-79
- 111.- Vacca A, Ria R, Ribatti D, Bruno M, Dammacco F. Angiogenesi e progressione tumorale nel melanoma [Angiogenesis and tumor progression in melanoma]. *Recenti Prog Med.* 2000 Nov; 91(11):581-7
- 112.- McGary EC, Onn A, Mills L, Heimberger A, Eton O, Thomas GW, Shtivelband M, Bar-Eli M. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity in vivo. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb; 122(2):400-5
113. - Liu G, Zhang F, Lee J, Dong Z. Selective induction of interleukin-8 expression in metastatic melanoma cells by transforming growth factor-beta 1. *Cytokine.* 2005 Aug 7; 31(3):241-9
114. - Melnikova VO, Bar-Eli M. Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res.* 2006 Oct; 19(5):395-405
115. - Seftor RE. Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha (v) beta3 integrin expression. *Am J Pathol.* 1998 Nov; 153(5):1347-517
116. - Geissinger E, Weisser C, Fischer P, Scharl M, Wellbrock C. Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res.* 2002 Aug 15; 62(16):4820-8
- 117.- Hearing VJ, Law LW, Corti A, Appella E, Blasi F. Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells. *Cancer Res.* 1988 Mar 1; 48(5):1270-8
- 118.- Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. *Biochim Biophys Acta.* 1997 May 27; 1356(3):271-80
- 119.- Wojtowicz-Praga S, Torri J, Johnson M, Steen V, Marshall J, Ness E, Dickson R, Sale M, Rasmussen HS, Chiodo TA, Hawkins MJ. Phase I trial of Marimastat, a novel matrix



metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Jun; 16(6):2150-6

120. - Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001 Sep; 7(9):987-9

121.- Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Niemeyer C, Rössler J. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J.* 2002 Aug; 16(10):1271-3

122.- Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10; 99(25):16069-74

123. - Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW. Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. *Am J Surg Pathol.* 2001 Aug; 25(8):1061-6

124.- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006 Apr; 54(4):385-95

125.- Feldmeyer L, Tetzlaff M, Fox P, Nagarajan P, Curry J, Ivan D, Torres Cabala CA, Prieto VG, Aung PP. Prognostic Implication of Lymphovascular Invasion Detected by Double Immunostaining for D2-40 and MITF1 in Primary Cutaneous Melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2016 Jul; 38(7):484-91

126. - Shayan R, Karnezis T, Murali R, Wilmott JS, Ashton MW, Taylor GI, Thompson JF, Hersey P, Achen MG, Scolyer RA, Stacker SA. Lymphatic vessel density in primary melanomas predicts sentinel lymph node status and risk of metastasis. *Histopathology.* 2012 Oct; 61(4):702-10

127. - Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol.* 1995 Nov; 177(3):275-83

128.- Aung PP, Leone D, Feller JK, Yang S, Hernandez M, Yaar R, Singh R, Helm T, Mahalingam M. Microvessel density, lymphovascular density, and lymphovascular invasion in primary cutaneous melanoma-correlation with histopathologic prognosticators and BRAF status. *Hum Pathol.* 2015 Feb; 46(2):304-12

129.- Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, Van den Eynden G, Rutten A, Ara M, Dirix LY, Van Laere S. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2014 Jan; 170(1):66-77

130. - Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 15; 19(2):577-83
131. - Depasquale I, Thompson WD. Prognosis in human melanoma: PAR-1 expression is superior to other coagulation components and VEGF. *Histopathology*. 2008 Mar; 52(4):500-9
132. - Brennecke S, Deichmann M, Naeher H, Kurzen H. Decline in angiogenic factors, such as interleukin-8, indicates response to chemotherapy of metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2005 Dec; 15(6):515-22
133. - Helfrich I, Edler L, Sucker A, Thomas M, Christian S, Schadendorf D, Augustin HG. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 15; 15(4):1384-92
134. Tejera-Vaquerizo A, Barrera-Vigo MV, López-Navarro N, Herrera-Ceballos E. Growth rate as a prognostic factor in localized invasive cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Feb; 24(2):147-54
135. -Nagore E, Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Guillén C. Growth rate as an independent prognostic factor in localized invasive cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 May; 25(5):618-20
- 136.- Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, Urist MM, Ariyan S, Sussman JJ, Edwards MJ, Chagpar AB, Martin RC, Stromberg AJ, Hagendoorn L, McMasters KM; Sunbelt Melanoma Trial. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg*. 2006 May; 243(5):693-8
137. - Kölmel KF, Kulle B, Lippold A, Seebacher C. Survival probabilities and hazard functions of malignant melanoma in Germany 1972-1996, an analysis of 10433 patients. Evolution of gender differences and malignancy. *Eur J Cancer*. 2002 Jul; 38(10):1388-94
- 138.- de Vries E, Nijsten TE, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Superior survival of females among 10,538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Ann Oncol*. 2008 Mar; 19(3):583-9
139. - Shaw HM, McGovern VJ, Milton GW, Farago GA, McCarthy WH. Malignant melanoma: influence of site of lesion and age of patient in the female superiority in survival. *Cancer*. 1980 Dec 15; 46(12):2731-5
140. - Joosse A, De Vries E, van Eijck CH, Eggermont AM, Nijsten T, Coebergh JW. Reactive oxygen species and melanoma: an explanation for gender differences in survival? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Jun; 23(3):352-64

- 141.- Davies JR, Randerson-Moor J, Kukulizch K, Harland M, Inherited variants in the MC1R gene and survival from cutaneous melanoma: a BioGenoMEL study. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012 May; 25(3):384-94
- 142.- Lira FE, Podlipnik S, Potrony M, Tell-Martí G, Calbet-Llopart N, Barreiro A, Carrera C, Malveyh J, Puig S. Inherited MC1R variants in patients with melanoma are associated with better survival in women. *Br J Dermatol.* 2020 Jan; 182(1):138-146
- 143.- Balch CM, Thompson JF, Gershenwald JE, Soong SJ, Ding S, McMasters KM, Coit DG, Eggermont AM, Gimotty PA, Johnson TM, Kirkwood JM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cochran AJ, Mihm MC Jr, Morton DL, Atkins MB, Flaherty KT, Sondak VK. Age as a predictor of sentinel node metastasis among patients with localized melanoma: an inverse correlation of melanoma mortality and incidence of sentinel node metastasis among young and old patients. *Ann Surg Oncol.* 2014 Apr; 21(4):1075-81
- 144.- Leiter U, Meier F, Schitteck B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol.* 2004 Jul 1; 86(4):172-8
- 145.- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer.* 1995 May 15; 75(10):2492-8
- 146.- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27; 417(6892):949-54
- 147.- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Guerrero I, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2002 Dec 1; 62(23):6997-7000
- 148.- Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1; 29(10):1239-46
- 149.- Curry JL, Torres-Cabala CA, Tetzlaff MT, Bowman C, Prieto VG. Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2012 Dec; 31(4):267-73

- 150.- Heppt MV, Siepmann T, Engel J, Schubert-Fritschle G. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer*. 2017 Aug 10; 17(1):536
151. - Tas F, Erturk K. Clinical and prognostic significance of BRAF V600E mutation in non-metastatic cutaneous melanoma patients. *Neoplasma*. 2019 Jul 23; 66(4):631-636
- 152.- Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Yan Y, Wongchenko M, Chang I, Hsu JJ, Koralek DO, Rooney I, Ribas A, Larkin J. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Sep; 17(9):1248-60
- 153.- Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Schachter J, Schadendorf D, Lesimple T, Plummer R, Ji R, Zhang P, Mookerjee B, Legos J, Kefford R, Dummer R, Kirkwood JM. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9; 377(19):1813-23
- 154.- Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, Koya RC, Samatar AA, Khanlou N, Braun J, Ruchalski K, Seifert H, Larkin J, Dahlman KB, Johnson DB, Algazi A, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell*. 2015 Feb 9; 27(2):240-56
- 155.- Catalanotti F, Cheng DT, Shoushtari AN, Johnson DB, Panageas KS, Momtaz P, Higham C, Won HH, Harding JJ, Merghoub T, Rosen N, Sosman JA, Berger MF, Chapman PB, Solit DB. *PTEN* Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma. *JCO Precis Oncol*. 2017 Jun 23; 1:PO.16.00054
156. – Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 18; 161(7):1681-96
157. - Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, Dobrovic A, McArthur G. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Aug; 24(4):666-72
158. - Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, Wang LE, Prieto VG, Gershenwald JE, Wei Q, Grimm EA. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 15; 17(2):229-35

- 159.- Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*. 2018 Sep 1; 124(17):3490-3499
- 160.- Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*. 2014 Apr 15; 5(7):1701-52
161. - Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10; 24(26):4340-6
162. - Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 20; 29(21):2904-9
- 163.- Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, Wolchock JD, Carvajal RD. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol*. 2011 Sep; 12(9):913-22
164. - Gong HZ, Zheng HY, Li J. The clinical significance of KIT mutations in melanoma: a meta-analysis. *Melanoma Res*. 2018 Aug; 28(4):259-270
165. - Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet*. 1996 Jan; 33(1):2-17
- 166.- Ranzani M, Alifrangis C, Perna D, Dutton-Regester K, Pritchard A, Wong K, Rashid M, Robles-Espinoza CD, Hayward NK, McDermott U, Garnett M, Adams DJ. BRAF/NRAS wild-type melanoma, NF1 status and sensitivity to trametinib. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015 Jan; 28(1):117-9
167. - Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet*. 1994 Sep; 8(1):15-21
- 168.- Young RJ, Waldeck K, Martin C, Foo JH, Cameron DP, Kirby L, Do H, Mitchell C, Cullinane C, Liu W, Fox SB, Dutton-Regester K, Hayward NK, Jene N, Dobrovic A, Pearson RB, Christensen JG, Randolph S, McArthur GA, Sheppard KE. Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jul; 27(4):590-600
- 169.- Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, Patch AM, Kakavand H, Alexandrov LB, Burke H, Jakrot V, Kazakoff S, Holmes O, Leonard C, Sabarinathan R, Mularoni L, Wood S, Xu Q, Waddell N, Tembe V, Pupo GM, De Paoli-Iseppi R, Vilain RE, Shang P, Lau LMS, Dagg RA, Schramm SJ, Pritchard A, Dutton-Regester K, Newell F, Fitzgerald A, Shang CA, Grimmond SM, Pickett HA, Yang JY, Stretch JR, Behren A, Kefford RF, Hersey P, Long GV, Cebon J, Shackleton M, Spillane AJ, Saw RPM, López-Bigas N, Pearson JV, Thompson

- JF, Scolyer RA, Mann GJ. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017 May 11; 545(7653):175-180
- 170.- Robertson AG, Shih J, Yau C, Gibb EA, Oba J, Mungall KL, Hess JM, Uzunangelov V, Walter V, Danilova L, Lichtenberg TM, Kucherlapati M, Kimes PK, Tang M, Penson A, Babur O, Akbani R, Bristow CA, Hoadley KA, Iype L, Chang MT; TCGA Research Network, Cherniack AD, Benz C, Mills GB, Verhaak RGW, Griewank KG, Felau I, Zenklusen JC, Gershenwald JE, Schoenfield L, Lazar AJ, Abdel-Rahman MH, Roman-Roman S, Stern MH, Cebulla CM, Williams MD, Jager MJ, Coupland SE, Esmaili B, Kandoth C, Woodman SE. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell*. 2017 Aug 14; 32(2):204-220
- 171.- Carvajal RD, Sosman JA, Quevedo JF, Milhem MM, Joshua AM, Kudchadkar RR, Linette GP, Gajewski TF, Lutzky J, Lawson DH, Lao CD, Flynn PJ, Albertini MR, Sato T, Lewis K, Doyle A, Ancell K, Panageas KS, Bluth M, Hedvat C, Erinjeri J, Ambrosini G, Marr B, Abramson DH, Dickson MA, Wolchok JD, Chapman PB, Schwartz GK. Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014 Jun 18; 311(23):2397-405
- 172.- Pouryazdanparast P, Brenner A, Haghighat Z, Guitart J, Rademaker A, Gerami P. The role of 8q24 copy number gains and c-MYC expression in amelanotic cutaneous melanoma. *Mod Pathol*. 2012 Sep; 25(9):1221-6
173. - Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, Felsher DW. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*. 2016 Apr 8; 352(6282):227-31
174. - Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 2015 Jul 9; 523(7559):231-5
175. - Escandell I, Martin Jm, Jordá E. Novel immunologic Approaches to Melanoma Treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2017 Oct; 108(8):708-720
176. - Vibhakkar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res*. 1997 Apr 10; 232(1):25-8
177. - Godoy-Gijón E, Yuste-Chaves M, Santos-Briz Á. BRAF Mutation Concordance between Primary Cutaneous Melanomas and Corresponding Metastases: A Review of the Latest Evidence. *Actas Dermosifiliogr*. 2017 Dec; 108(10):894-901
- 178.- Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini M, Franco R, Botti G, Caracò C, Mozzillo N, Ascierto PA, Palmieri G. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 10; 30(20):2522-9

- 179.- Riveiro-Falkenbach E, Villanueva CA, Garrido MC, Ruano Y, García-Martín RM, Godoy E, Ortiz-Romero PL, Ríos-Martín JJ, Santos-Briz A, Rodríguez-Peralto JL. Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF (V600E) Mutations in Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol.* 2015 Dec; 135(12):3078-3085
- 180.- Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, Pavlick AC, Darvishian F, Christos P, Mazumdar M, Osman I, Polsky D. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One.* 2012; 7(1):e29336
181. - Dai B, Cai X, Kong YY, Yang F, Shen XX, Wang LW, Kong JC. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: with a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences. *Hum Pathol.* 2013 Aug; 44(8):1472-8
182. - Lee SH, Kim JE, Jang HS, Park KH, Oh BH, Shin SJ, Chung KY, Roh MR, Rha SY. Genetic Alterations among Korean Melanoma Patients Showing Tumor Heterogeneity: A Comparison between Primary Tumors and Corresponding Metastatic Lesions. *Cancer Res Treat.* 2018 Oct; 50(4):1378-87
- 183.- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2; 363(23):2191-9
- 184.- Clemente C, Cook M, Ruiter D, Mihm M. Histopathologic diagnosis of melanoma. World Health Organization Melanoma Programme Publications. Trezzano SN: Milan; 2001.
185. - Ackerman A, Cerroni L, Kerl H. Pitfalls in Histopathologic Diagnosis of Malignant Melanoma. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.
- 186.- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Mar; 104(2):99-127
- 187.- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Apr; 104(3):181-203
188. - Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* 2008 Nov; 35 Suppl 2:1-10
189. - Wallace ML, Smoller BR. Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology. *J Am Acad Dermatol.* 1996 Feb; 34(2 Pt 1):163-83; quiz 184-6. Review
190. - El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma in situ on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis. *Am J Dermatopathol.* 2004 Oct; 26(5):364-6
191. - Hoang MP, Mahalingam M, Selim MA. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous neoplasms. *Future Oncol.* 2010 Jan; 6(1):93-109

- 192.- Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, Dadras SS. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol*. 2010 Sep; 37(9):944-52
- 193.- Lawley LP, Cerimele F, Weiss SW, North P. Expression of Wilms Tumor 1 gene distinguishes vascular malformation from proliferative endothelial lesions. *Arch Dermatol*. 2005 Oct; 141(10):1297-300.
194. - Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer*. 1999 Dec 1; 86(11):2406-12
- 195.- Hernández López, Patricia; Rodríguez Peralto, José Luis; Ruano Domínguez, Yolanda (2017) Aplicación de la técnica de Hibridación Genómica Comparada en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con melanoma. *Diana*. 2017 Sept; 6 (2): e20170904.
- 196.- Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, Matushek P 4th, Legator M, Jacobson K, Dalton SR, Charzan S, Kolaitis NA, Guitart J, Lertsbarapa T, Boone S, LeBoit PE, Bastian BC. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Aug; 33(8):1146-56
- 197.- Dalton SR, Gerami P, Kolaitis NA, Charzan S, Werling R, LeBoit PE, Bastian BC. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to distinguish intranodal nevus from metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 Feb; 34(2):231-7
- 198.- Gerami P, Barnhill RL, Beilfuss BA, LeBoit P, Schneider P, Guitart J. Superficial melanocytic neoplasms with pagetoid melanocytosis: a study of interobserver concordance and correlation with FISH. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jun; 34(6):816-21
- 199.- North JP, Vetto JT, Murali R, White KP, White CR Jr, Bastian BC. Assessment of copy number status of chromosomes 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2011 Aug; 35(8):1146-50
- 200.- Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, Balch C, Bandiera D, Barchuk A, Bufalino R, Craig P, De Marsillac J, Durand JC, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm. *N Engl J Med*. 1988 May 5; 318(18):1159-62
- 201.- Johnson TM, Smith JW 2nd, Nelson BR, Chang A. Current therapy for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995 May; 32(5 Pt 1):689-707; quiz 708-9. Review
- 202.- Mraz-Gernhard S, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M, Miller JR 3rd, Leong SP. Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol*. 1998 Aug; 134(8):983-7
203. - Leiter U, Buettner PG, Bohnenberger K, Eigentler T, Meier F, Moehrle M, Breuninger H, Garbe C. Sentinel lymph node dissection in primary melanoma reduces subsequent regional



lymph node metastasis as well as distant metastasis after nodal involvement. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jan; 17(1):129-37

204. - Guidelines Working P. Clinical Practice Guidelines for the Management of Melanoma in Australia and New Zealand. Sydney and Auckland: [www.cancer.org.au/skincancerguides](http://www.cancer.org.au/skincancerguides);2008.

205.- Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr; 52(4):1071-1080

206. - Jilaveanu LB, Aziz SA, Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma do the work? *Clin Dermatol*. 2009 Nov-Dec; 27(6):614-25

207. - Young SE, Martinez SR, Essner R. The role of surgery in treatment of stage IV melanoma. *J Surg Oncol*. 2006 Sep 15; 94(4):344-51

208.- Burmeister BH, Henderson MA, Ainslie J, Fisher R, Di Iulio J, Smithers BM, Hong A, Shannon K, Scolyer RA, Carruthers S, Coventry BJ, Babington S, Duprat J, Hoekstra HJ, Thompson JF. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jun; 13(6):589-97

209.- Samlowski WE, Watson GA, Wang M, Rao G, Klimo P Jr, Boucher K, Shrieve DC, Jensen RL. Multimodality treatment of melanoma brain metastases incorporating stereotactic radiosurgery (SRS). *Cancer*. 2007 May 1; 109(9):1855-62

210.- Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Nov 13; 371(20):1867-76

211. - Drake CG, Lipson EJ, Brahmer JR. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Jan; 11(1):24-37

212.- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28; 366(26):2443-54

213.- Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I, Agarwala SS, Milhem M, Cranmer L, Curti B, Lewis K, Ross M, Guthrie T, Linette GP, Daniels GA, Harrington K, Middleton MR, Miller WH Jr, Zager JS, Ye Y, Yao B, Li A,

- Doleman S, VanderWalde A, Gansert J, Coffin RS. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 1; 33(25):2780-8
214. - Call ME, Wucherpennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:101-25
215. - Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15; 12(4):298-306
- 216.- Ishii H, Azuma K, Kawahara A, Yamada K, Imamura Y, Tokito T, Kinoshita T, Kage M and Hoshino T. Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015 Mar; 10(3):426-30
217. - Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22; 12(4):252-64
218. - Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*. 1986 Aug; 55(2):244-8
219. - Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods*. 1987 Oct 23; 103(1):121-9
- 220.- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul; 4(7):844-7
221. - Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000 Dec; 80(12):1943-9
- 222.- Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer*. 2001 Oct 1; 94(1):1-5
- 223.-R Core Team (2020). The R Foundation for Statistical Computing <http://www.R-project.org>).
- 224.-Therneau T, Atkinson B. (2019) rpart: Recursive partitioning and regression trees. R package version 4.1-15. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/rpart/index.html> [Last accessed 10th Sep 2020]
- 225.-Stephen Milborrow (2019). rpart.plot: Plot 'rpart' Models: an enhanced Version of 'plot.rpart'. R package version 3.0.8. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot> [Last accessed 10th Sep 2020]
- 226.-Liaw A and Wiener M (2018). Breiman and Cutler's Random Forest for classification and regression. R package version 4.6-14. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/randomForest/index.html> [Last accessed 10th Sep 2020]

- 227.-Ferrari A, Bono A, Baldi M, Collini P, Casanova M, Pennacchioli E, Terenziani M, Marcon I, Santinami M, Bartoli C. Does melanoma behave differently in younger children than in adults? A retrospective study of 33 cases of childhood melanoma from a single institution. *Pediatrics*. 2005 Mar; 115(3):649-54
- 228.- Day CL Jr, Sober AJ, Kopf AW, Lew RA, Mihm MC Jr, Hennessey P, Golomb FM, Harris MN, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Postel A, Grier WR, Mintzis MN, Fitzpatrick TB. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the upper extremity. The importance of anatomic subsites in predicting recurrent disease. *Ann Surg*. 1981 Apr; 193(4):436-40
- 229.- Gillgren P, Brattström G, Frisell J, Persson JO, Ringborg U, Hansson J. Effect of primary site on prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. A study using a new model to analyse anatomical locations. *Melanoma Res*. 2005 Apr; 15(2):125-32
- 230.- Christos PJ, Oliveria SA, Berwick M, Guerry D4th, Elder DE, Synnestvedt M, Fine JA, Barnhill RL, Halpern AC. Signs and symptoms of melanoma in older populations. *J Clin Epidemiol*. 2000 Oct; 53(10):1044-53
- 231.- Sánchez Yus E, Herrera M, Simón RS, Requena L. Pero...hubo alguna vez una clasificación de Clark de los melanomas? *Actas Dermosifiliogr*. 2010 Jan-Feb; 101(1):19-30.
- 232.- de Almeida LS, Requena L, Rütten A, Kutzner H, Garbe C, Pestana D, Gomes MM. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathologic analysis of 113 cases. *Am J Dermatopathol*. 2008 Jun; 30(3):207-15
- 233.- Hawkins WG, Busam KJ, Ben-Porat L, Panageas KS, Coit DG, Gyorki DE, Linehan DC, Brady MS. Desmoplastic melanoma: a pathologically and clinically distinct form of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2005 Mar; 12(3):207-13
- 234.- Livestro DP, Muzikansky A, Kaine EM, Flotte TJ, Sober AJ, Mihm MC Jr, Michaelson JS, Cosimi AB, Tanabe KK. Biology of desmoplastic melanoma: a case-control comparison with other melanomas. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20; 23(27):6739-46
- 235.- Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica. *Actas Dermosifiliogr*. 2009 Nov; 100(9):759-66
- 236.- Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol*. 1987 Oct; 123(10):1326-30
- 237.- Shaw HM, Rivers JK, McCarthy SW, McCarthy WH. Cutaneous melanomas exhibiting unusual biologic behavior. *World J Surg*. 1992 Mar-Apr; 16(2):196-202

- 238.- Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto VG, Rabkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. *Arch Dermatol*. 2002 May; 138(5):603-8
- 239.- Zugna D, Senetta R, Osella-Abate S, Fierro MT, Pisacane A, Zaccagna A, Sapino A, Bataille V, Maurichi A, Picciotto F, Cassoni P, Quaglino P, Ribero S. Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. *Br J Cancer*. 2018 Feb 6; 118(3):398-404
- 240.- Gualano MR, Osella-Abate S, Scaioli G, Marra E, Bert F, Faure E, Baduel ES, Balagna E, Quaglino P, Fierro MT, Siliquini R, Ribero S. Prognostic role of histological regression in primary cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2018 Feb; 178(2):357-362
- 241.- Tejera-Vaquerizo A, Solís-García E, Ríos-Martín JJ, Moreno-Ramírez D. Factores pronósticos en el melanoma cutáneo primario no incluidos en la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) [Primary cutaneous melanoma: prognostic factors not included in the classification of the American Joint Committee on Cancer]. *Actas Dermosifiliogr*. 2011 May; 102(4):255-63
242. - Sheen YS, Liao YH, Lin MH, Chen JS, Liao JY, Liang CW, Chang YL, Chu CY. Clinicopathological features and prognosis of patients with de novo versus nevus-associated melanoma in Taiwan. *PLoS One*. 2017 May 4; 12(5):e0177126.
243. - Sheen YS, Liao YH, Lin MH, Chen JS, Liao JY, Liang CW, Chang YL, Chu CY. Clinicopathological features and prognosis of patients with de novo versus nevus-associated melanoma in Taiwan. *PLoS One*. 2017 May 4; 12(5):e0177126.
244. - Drunkenmölle E, Marsch WCh, Lübke D, Helmbold P. Paratumoral epidermal hyperplasia: a novel prognostic factor in thick primary melanoma of the skin? *Am J Dermatopathol*. 2005 Dec; 27(6):482-8.
245. - Måsbäck A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res*. 2001 Oct; 11(5):435-45.
- 246.- Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res*. 2002 Jun; 12(3):271-8.
- 247.- Echeverría B, Botella-Estrada R, Serra-Guillén C, Martorell A, Traves V, Requena C, Sanmartín O, Llombart B, Guillén C, Nagore E. Riesgo aumentado del desarrollo de un segundo melanoma cutáneo primario sobre un nevo en pacientes diagnosticados previamente de melanoma cutáneo primario sobre nevo. *Actas Dermosifiliogr*. 2010 Oct; 101(8):710-6

- 248.- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR 3rd. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2001 Sep; 137(9):1169-73
249. - Tas F, Erturk K. Histological lymphovascular invasion is associated with nodal involvement, recurrence, and survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Int J Dermatol*. 2017 Feb; 56(2):166-170.
250. - Handley WS. The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *Lancet* 1907; 927:996-998
- 251.- Lugassy C, Christensen L, Le Charpentier M, Faure E, Escande JP. Ultrastructural and immunohistochemical observations concerning laminin in B16 melanoma. Is an amorphous form of laminin promoting a non hematogenous migration of tumor cells? *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998 Jan; 30(1):137-44
- 252.- Lugassy C, Vernon SE, Busam K, Engbring JA, Welch DR, Poulos EG, Kleinman HK, Barnhill RL. Angiotropism of human melanoma: studies involving in transit and other cutaneous metastases and the chicken chorioallantoic membrane: implications for extravascular melanoma invasion and metastasis. *Am J Dermatopathol*. 2006 Jun; 28(3):187-93
253. - Van Es SL, Colman M, Thompson JF, McCarthy SW, Scolyer RA. Angiotropism is an independent predictor of local recurrence and in-transit metastasis in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2008 Sep; 32(9):1396-403.
- 254.- Newlin HE, Morris CG, Amdur RJ, Mendenhall WM. Neurotropic melanoma of the head and neck with clinical perineural invasion. *Am J Clin Oncol*. 2005 Aug; 28(4):399-402
255. - Tas F, Erturk K. Neurotropism as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. *Neoplasma*. 2018; 65(2):304-308
- 256.- Varey AHR, Goumas C, Hong AM, Mann GJ, Fogarty GB, Stretch JR, Saw RPM, Spillane AJ, Shannon KF, Lee KJ, Quinn MJ, Thompson JF, Scolyer RA. Neurotropic melanoma: an analysis of the clinicopathological features, management strategies and survival outcomes for 671 patients treated at a tertiary referral center. *Mod Pathol*. 2017 Nov; 30(11):1538-1550
- 257.- Gamsizkan M, Yilmaz I, Buyukbabani N, Demirkesen C, Demiriz M, Cetin ED, Ince U, Akalin T, Demirkan NC, Lebe B, Erdem O, Gokoz O, Sakiz D, Demireli PT, Astarci HM, Adim SB, Zemheri IE, Acikalin A, Yaman B, Aydin O, Bassorgun CI. A retrospective multicenter evaluation of cutaneous melanomas in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(23):10451-6
- 258.- Wong PF, Wei W, Smithy JW, Acs B, Toki MI, Blenman KRM, Zelterman D, Kluger HM, Rimm DL. Multiplex Quantitative Analysis of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Immunotherapy Outcome in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2019 Apr 15; 25(8):2442-2449

- 259.- Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28; 105(1):93-103
- 260.- Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wilttrout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, et al. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1993 Dec 1; 53(23):5613-6
261. - Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, Li C, Wang Y, Xue Y, Song X, Li H, Li G. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019 Apr 3; 8(7):1593806
262. - Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest*. 2006 Mar; 86(3):231-45
- 263.- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep; 10(9):942-9
264. - Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *J Immunol*. 2017 Feb 1; 198(3):981-985
- 265.- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul; 10(7):490-500
- 266.- Kluger HM, Zito CR, Barr ML, Baine MK et al. Characterization of PD L1 Expression and Associated Tcell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clin Cancer Res*. 2015 Jul 1; 21(13):3052-60
267. - Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1; 105(13):5201-6
268. - Yu J, Ren X, Cao S, Zhang W, Hao X. Th1 polarization and apoptosis-inducing activity of CD4+ T -cells in cytokine-induced killers might favor the antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killers in vivo. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006 Jun; 21(3):276-84
- 269.- Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, Koura K, Takahashi R, Otsuka H, Takahashi H, Iwakuma N, Nakagawa S, Fujii T, Sasada T, Yamaguchi R, Yano H, Shirouzu K, Kage M. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol*. 2013 Jul; 1(4):625-632

270. - de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2017 Aug 9; 6(11):e1356148
271. - Knol AC, Nguyen JM, Quéreux G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp Dermatol*. 2011 May; 20(5):430-4
- 272.- Gerber AL, Müntz A, Schlapbach C, Shafighi M, Kiermeir D, Hüsler R, Hunger RE. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *Br J Dermatol*. 2014 Jan; 170(1):103-9
- 273.- Jensen SM, Twitty CG, Maston LD, Antony PA, Lim M, Hu HM, Petrausch U, Restifo NP, Fox BA. Increased frequency of suppressive regulatory T cells and T cell-mediated antigen loss results in murine melanoma recurrence. *J Immunol*. 2012 Jul 15; 189(2):767-76
- 274.- Wang X, Cui Y, Luo G, Wang Q, Hu J, He W, Yuan J, Zhou J, Wu Y, Sun X, Robson SC, Li X, Tan J, Peng Y, Xue G, Lu L, Gao W, Wu J. Activated mouse CD4(+)Foxp3(-) T cells facilitate melanoma metastasis via Qa-1-dependent suppression of NK-cell cytotoxicity. *Cell Res*. 2012 Dec; 22(12):1696-706
- 275.- Ma MW, Medicherla RC, Qian M, Vega-Saenz de Miera E, Friedman EB, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Ott PA, Bhardwaj N, Shao Y, Osman I, Darvishian F. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol*. 2012 Jul; 25(7):1000-10
276. - Lee GR. Phenotypic and functional properties of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Mediators Inflamm*. 2017 Dec; 31:1–9.
- 277.- Melief SM, Visconti VV, Visser M, van Diepen M, Kapiteijn EH, van den Berg JH, Haanen JB, Smit VT, Oosting J, van der Burg SH, Verdegaal EM. Long-term Survival and Clinical Benefit from Adoptive T-cell Transfer in Stage IV Melanoma Patients Is Determined by a Four-Parameter Tumor Immune Signature. *Cancer Immunol Res*. 2017 Feb; 5(2):170-179
- 278.- Reissfelder C, Stamova S, Gossmann C, Braun M, Bonertz A, Walliczek U, Grimm M, Rahbari NN, Koch M, Saadati M, Benner A, Büchler MW, Jäger D, Halama N, Khazaie K, Weitz J, Beckhove P. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest*. 2015 Feb; 125(2):739-51
- 279.- Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, Velcheti V, Syrigos KN, Herbst RS, Rimm DL. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Feb 3; 107(3):dju435
280. - Kim MT, Harty JT. Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol*. 2014 Jun 19; 5:295

281. - Fridman WH, Remark R, Goc J, Giraldo NA, Becht E, Hammond SA, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Sautès-Fridman C. The immune microenvironment: a major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014; 164(1):13-26
- 282.- Parrot T, Oger R, Allard M, Desfrancois J, Raingeard de la Blétière D, Coutolleau A, Preisser L, Khammari A, Dréno B, Delneste Y, Guardiola P, Fradin D, Gervois N. Transcriptomic features of tumour-infiltrating CD4<sup>low</sup>CD8<sup>high</sup> double positive  $\alpha\beta$  T cells in melanoma. *Sci Rep.* 2020 Apr 3; 10(1):5900
283. - Gulsun Erdag, Jochen T Schaefer, Mark E Smolkin, Donna H Deacon. Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. *Cancer Res.* 2012 Mar 1; 72(5):1070-80
- 284.- Yang C, Lee H, Pal S, Jove V, Deng J, Zhang W, Hoon DS, Wakabayashi M, Forman S, Yu H. B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis. *PLoS One.* 2013 May 29; 8(5):e64159
- 285.- Porcellato I, Silvestri S, Menchetti L, Recupero F, Mechelli L, Sforna M, Iussich S, Bongiovanni L, Lepri E, Brachelente C. Tumour-infiltrating lymphocytes in canine melanocytic tumours: An investigation on the prognostic role of CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> lymphocytic populations. *Vet Comp Oncol.* 2020 Sep; 18(3):370-380
- 286.- Somasundaram R, Zhang G, Fukunaga-Kalabis M, Perego M, Krepler C, Xu X, Wagner C, Hristova D, Zhang J, Tian T, Wei Z, Liu Q, Garg K, Griss J, Hards R, Maurer M, Hafner C, Mayerhöfer M, Karanikas G, Jalili A, Bauer-Pohl V, Weihsengruber F, Rappersberger K, Koller J, Lang R, Hudgens C, Chen G, Tetzlaff M, Wu L, Frederick DT, Scolyer RA, Long GV, Damle M, Ellingsworth C, Grinman L, Choi H, Gavin BJ, Dunagin M, Raj A, Scholler N, Gross L, Beqiri M, Bennett K, Watson I, Schaidler H, Davies MA, Wargo J, Czerniecki BJ, Schuchter L, Herlyn D, Flaherty K, Herlyn M, Wagner SN. Tumor-associated B-cells induce tumor heterogeneity and therapy resistance. *Nat Commun.* 2017 Sep 19; 8(1):607
- 287.- Castaneda CA, Castillo M, Aliaga K, Bernabe LA, Casavilca S, Sanchez J, Torres-Cabala CA, Gomez HL, Mas L, Dunstan J, Cotrina JM, Abugattas J, Chavez I, Ruiz E, Montenegro P, Rojas V, Orrego E, Galvez-Nino M, Felix B, Landa-Baella MP, Vidaurre T, Villa MR, Zevallos R, Taxa L, Guerra H. Level of tumor-infiltrating lymphocytes and density of infiltrating immune cells in different malignancies. *Biomark Med.* 2019 Dec; 13(17):1481-91
- 288.- Wang J, Cao Z, Zhang XM, Nakamura M, Sun M, Hartman J, Harris RA, Sun Y, Cao Y. Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. *Cancer Res.* 2015 Jan 15; 75(2):306-15
289. - Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2013 Jul; 94(1):25-39



290. - Borczuk AC, Allen TC. PD-L1 and Lung Cancer: The Era of Precision-ish Medicine? Arch Pathol Lab Med. 2016 Apr; 140(4):351-4
291. - Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med. 2012 Mar 28; 4(127):127ra37
- 292.- Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res. 2004 Aug 1; 10(15):5094-100
- 293.- Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT, Capelozzi V, Dacic S, Hariri L, Kerr KM, Lantuejoul S, Mino-Kenudson M, Raparia K, Rekhtman N, Roy-Chowdhuri S, Thunnissen E, Tsao MS, Yatabe Y; Members of Pulmonary Pathology Society. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry--A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. Arch Pathol Lab Med. 2016 Apr; 140(4):341-4
- 294.- Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, Stanforth D, Jansson M, Lubiniecki GM, Ponto G, Emancipator K. Development of a Companion Diagnostic for Pembrolizumab in Non-Small Cell Lung Cancer Using Immunohistochemistry for Programmed Death Ligand-1. Arch Pathol Lab Med. 2016 Nov; 140(11):1243-49
295. - Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol. 1998 Feb; 11(2):155-68
296. - Mahoney KM, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. Oncology (Williston Park). 2014 Nov; 28 Suppl 3:39-48
- 297.- Hamilton R, Krauze M, Romkes M, Omolo B, Konstantinopoulos P, Reinhart T, Harasymczuk M, Wang Y, Lin Y, Ferrone S, Whiteside T, Bortoluzzi S, Werley J, Nukui T, Fallert-Junecko B, Kondziolka D, Ibrahim J, Becker D, Kirkwood J, Moschos S. Pathologic and gene expression features of metastatic melanomas to the brain. Cancer. 2013 Aug 1; 119(15):2737-46
- 298.- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. 2014 Oct 1; 20(19):5064-74
- 299.- Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF, Hersey P, Long GV, Scolyer RA. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. Mod Pathol. 2015 Dec; 28(12):1535-44

- 300.- Kakavand H, Wilmott JS, Menzies AM, Vilain R, Haydu LE, Yearley JH, Thompson JF, Kefford RF, Hersey P, Long GV, Scolyer RA. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 15; 21(14):3140-8
- 301.- Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, Yearley JH, Kefford RF, Thompson JF, Long GV, Hersey P, Scolyer RA. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 May; 28(3):245-53
302. - Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011 Sep 16; 146(6):873-87
- 303.- Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K y cols. VEGF-c induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood.* 2007 Feb 1; 109(3):1010-7
304. - Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol.* 2003 Jun; 162(6):1951-60
- 305.- Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* 2000 Jan; 80(1):99-115
- 306.- Pastushenko I, Vermeulen PB, Vicente-Arregui S, Van den Eynden GG. Peritumoral D2-40 Chalkley score independently predicts metastases and survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol.* 2015 Oct; 42(10):699-711
- 307.- Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer.* 2006 Dec 18; 95(12):1611-25
- 308.- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst.* 2005 Aug 17; 97(16):1180-4
- 309.- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3; 324(1):1-8
310. - Chalkley HW, Cornfield J, Park H. A Method for Estimating Volume-Surface Ratios. *Science.* 1949 Sep 23; 110(2856):295-7

311. - Karslioğlu Y, Yiğit N, Öngürü Ö. Chalkley method in the angiogenesis research and its automation via computer simulation. *Pathol Res Pract*. 2014 Mar; 210(3):161-8
- 312.- Barnhill RL, Busam KJ, From L, Bagot M, Lugassy C, Berwick M. Inter-observer concordance for the recognition of angiotropism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Jun; 24(3):582-3
- 313.- Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, Ho B, Cook M, Mohammed RA, Patel PM, Ellis IO, Newton-Bishop JA, Martin SG. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol*. 2012 Apr; 25(4):493-504
314. - Eichten A, Hyun WC, Coussens LM. Distinctive features of angiogenesis and lymphangiogenesis determine their functionality during de novo tumor development. *Cancer Res*. 2007 Jun 1; 67(11):5211-20
315. - Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*. 2001 Sep 17; 194(6):797-808
- 316.- Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002 Jun 7; 296(5574):1883-6